



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária/ Instituto Superior de  
Agronomia

DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* vs DIGESTIBILIDADE *IN VIVO* – APLICAÇÃO A REGIMES  
ALIMENTARES DE MONOGÁSTRICOS

MÓNICA FILIPA MARREIROS PESSOA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

PRESIDENTE

Doutor Rui José Branquinho de Bessa

ORIENTADOR

Doutora Luísa Almeida Lima Falcão  
e Cunha

VOGAIS

Doutora Luísa Almeida Lima Falcão e Cunha

CO-ORIENTADOR

Doutora Maria Madalena dos Santos Lordelo

Doutor João Pedro Bengala Freire

2016

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária/ Instituto Superior de  
Agronomia

DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* vs DIGESTIBILIDADE *IN VIVO* – APLICAÇÃO A REGIMES  
ALIMENTARES DE MONOGÁSTRICOS

MÓNICA FILIPA MARREIROS PESSOA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM ENGENHARIA ZOOTÉCNICA –  
PRODUÇÃO ANIMAL

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

PRESIDENTE

Doutor Rui José Branquinho de Bessa

ORIENTADOR

Doutora Luísa Almeida Lima Falcão  
e Cunha

VOGAIS

Doutora Luísa Almeida Lima Falcão e Cunha

CO-ORIENTADOR

Doutora Maria Madalena dos Santos Lordelo

Doutor João Pedro Bengala Freire

2016

LISBOA

## **Agradecimentos**

Tenho a agradecer, especialmente, à minha orientadora Professora Doutora Luísa Falcão e Cunha e ao meu namorado, Telmo Dias, por todo o apoio incondicional e por, mais importante, terem acreditado sempre que eu iria terminar. Sem eles não seria possível. Muito obrigada!

Ao Professor Doutor João Pedro Bengala Freire pela cedência de conhecimentos.

À minha mãe e companheira, por todo o apoio e incentivo.

Patrícia Nunes, Patrícia Alves, Elisabete Fernandes, D. Lurdes, muito obrigada.

Tenho a agradecer também a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para que fosse possível, umas pelo apoio, outras pela companhia, outras pela ajuda.

**Título:** Digestibilidade *in vitro* vs Digestibilidade *in vivo* – aplicação a regimes alimentares de monogástricos

### **Resumo**

O objetivo do presente trabalho foi aferir a possibilidade de substituição da digestibilidade *in vivo* pela simulação laboratorial, comparando os resultados obtidos *in vivo* e *in vitro*. Para esse efeito foram tidas em conta dietas alimentares com o mesmo teor de fibra e de proteína, em duas espécies, designadamente, suínos e coelhos, e ainda mais quatro regimes, para os coelhos, com progressiva substituição por um alimento, a planta *Brachiaria*, correspondendo a um aumento progressivo do teor de fibra do regime alimentar.

Os valores da MS e MO nos suínos apresentaram resultados significativamente diferentes *in vivo* e *in vitro*, sendo respetivamente, em média, 87% e 80%. Por sua vez os valores para coelhos foram também significativamente diferentes embora menos distantes, sendo, em média, mais próximos para qualquer regime, cifrando uma diferença de 2%.

Os resultados da PB foram sempre superiores *in vitro* do que *in vivo*.

O método teve um efeito altamente significativo nos resultados, levando a concluir que a digestibilidade *in vitro* não pode ser utilizada para estimar o valor nutritivo de regimes alimentar. No entanto, é possível a sua utilização para evidenciar efeitos de diferentes regimes na digestibilidade global e da proteína bruta.

**Palavras-chave:** Digestibilidade, *in vivo*, *in vitro*, suínos, coelhos, fibra.

**Title:** *In vitro* digestibility vs *In vivo* digestibility – Application of monogastrics complete diets

### **Abstract**

This work aims to study the possibility of replacing *in vivo* digestibility with a laboratory simulation of digestion, comparing the *in vivo* and *in vitro* results. For that matter, were taken into account complete diets with the same percentage of fiber and protein on two species, those two being pigs and rabbits, and four different complete diets, with progressive replacement of a feed ingredient, the *Brachiara* plant, matching the progressive increase of fiber percentage .

The values of DM and OM on pigs showed significantly different results *in vivo* and *in vitro*, being respectively, on average, 87% and 80%. On the other side, the percentages for rabbits were also significantly different even though they were less significant, being, on average, closer to any regimen, showing a difference of 2%.

The results of the CP *in vitro* were always above the *in vivo*.

The method used had a highly significant effect on the results, taking us to conclude that the digestibility *in vitro* can't be utilized to estimate the nutritional value of complete diets. However, it's possible to use it to point out certain effects on different complete diets of global digestibility and CP.

**Key words:** Digestibility; *in vivo*; *in vitro*; pigs; rabbits; fibre.

## Índice geral

Agradecimentos .....	II
Resumo .....	III
Abstract.....	IV
Índice geral.....	V
Índice de Tabelas .....	VII
Índice de Gráficos .....	VIII
Lista de Abreviaturas .....	IX
1. Introdução Geral.....	1
1.1. Enquadramento do Tema.....	1
2. Revisão Bibliográfica .....	2
2.1. Processo digestivo .....	2
2.1.1. Suínos .....	3
▪ Digestão dos constituintes da parede vegetal .....	4
2.1.2. Coelhos .....	4
3. Quantificação da digestão .....	5
3.1. Medição da digestibilidade aparente .....	5
3.1.1 Fatores que afetam a digestibilidade dos alimentos .....	6
4. Métodos de estimativa da digestibilidade <i>in vitro</i> .....	6
4.1. Os métodos <i>in vitro</i> nos monogástricos .....	8
• Método de Diálise da Célula:.....	8
• Métodos Colorimétricos: .....	8
• Métodos de “filtração”:.....	8
○ Sistemas de “Um passo”: .....	8
▪ Fluidos intestinais.....	8
○ Sistemas de “Dois passos”:.....	9
▪ Fluidos Pepsino-Jejunais.....	9
▪ Pepsina pancreatina .....	9
○ Sistemas de “Três passos”:.....	9
▪ Pepsina pancreatina – fluidos ruminais.....	9
▪ Pepsina pancreatina – enzimas de degradação de fibra .....	10
4.2. Os diversos métodos nos Monogástricos.....	10
4.2.1. Método com validade geral.....	10
4.2.2. Variabilidade inter e intra-laboratorial .....	11
4.2.3. GTP – Técnica de produção de gás.....	13

<b>5. Procedimentos experimentais/ Materiais e Métodos</b> .....	14
<b>5.1. Regimes</b> .....	14
5.1.1. Regime dos Suínos com Repiso de Tomate .....	15
5.1.2. Regime dos Coelhos com Repiso de Tomate.....	17
5.1.3. Regime dos Coelhos com a planta <i>Brachiaria</i> .....	19
<b>5.2. Protocolo Experimental</b> .....	20
5.2.1. Digestibilidade <i>in vitro</i> para Suínos .....	20
5.2.2. Digestibilidade <i>in vitro</i> para Coelhos.....	21
<b>5.3. Análises químicas específicas</b> .....	22
5.3.1. Determinação da Matéria Seca .....	22
5.3.2. Determinação da Cinza/ Matéria Orgânica .....	23
5.3.3. Determinação da Fibra.....	23
5.3.4. Determinação da Proteína Bruta .....	23
<b>5.4. Análise estatística</b> .....	23
<b>6. Resultados e Discussão</b> .....	23
6.1. Suínos .....	24
6.2. Coelhos – Ensaio com Repiso de Tomate.....	29
6.3. Coelhos – Ensaio com a Planta <i>Brachiaria</i> .....	35
<b>7. Conclusões e perspectivas futuras</b> .....	42
<b>8. Referências Bibliográficas</b> .....	43

## Índice de Tabelas

Tabela 1 – Composição centesimal dos 4 regimes alimentares para suínos com inclusão de repiso de tomate e/ ou banha, em % .....	15
Tabela 2 – Composição química dos 4 regimes alimentares para suínos com inclusão de repiso de tomate e/ ou banha, em % de MS .....	16
Tabela 3 – Composição centesimal de 4 regimes distribuídos aos coelhos com inclusão de repiso de tomate ou vit. E, em % .....	17
Tabela 4 – Composição química dos 4 regimes distribuídos aos coelhos com inclusão de repiso de tomate ou vit. E, em % de MS .....	18
Tabela 5 – Composição centesimal do regime controlo e dos regimes alimentares para coelhos em crescimento com a inclusão de proporções crescentes de <i>Brachiara</i> , em %.....	19
Tabela 6 – Composição química do regime controlo e dos regimes alimentares para coelhos em crescimento com a inclusão de proporções crescentes de <i>Brachiara</i> , em % de MS .....	20
Tabela 7 – Estatística descritiva relativa a análise da digestibilidade dos alimentos para Suínos para o Ensaio Repiso de Tomate.....	24
Tabela 8 – Matriz de correlação dos valores de digestibilidade <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> dos regimes alimentares para Suínos para o ensaio Repiso de Tomate.....	25
Tabela 9 – Análise de Variância relativa aos valores de digestibilidade <i>in vitro</i> e <i>in vitro</i> dos regimes alimentares para Suínos para o Ensaio Repiso de Tomate.....	26
Tabela 10 – Estatística descritiva relativa a análise da digestibilidade dos alimentos para Coelhos para o Ensaio Repiso de Tomate.....	29
Tabela 11 – Matriz de correlação dos valores de digestibilidade <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> dos regimes alimentares para Coelhos para o ensaio Repiso de Tomate .....	31
Tabela 12 – Análise de Variância relativa aos valores de digestibilidade <i>in vitro</i> e <i>in vitro</i> dos regimes alimentares para Coelhos para o Ensaio Repiso de Tomate.....	32
Tabela 13 – Estatística descritiva relativa a análise da digestibilidade dos alimentos para Coelhos para o Ensaio <i>Brachiaria</i> .....	35
Tabela 14 – Matriz de correlação dos valores de digestibilidade <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> dos regimes alimentares para Coelhos para o ensaio <i>Brachiaria</i> .....	37
Tabela 15 – Análise de Variância relativa aos valores de digestibilidade <i>in vitro</i> e <i>in vitro</i> dos regimes alimentares para Coelhos para o Ensaio <i>Brachiaria</i> .....	38



## Índice de Gráficos

Gráfico 1 – Análise de variância relativa à digestibilidade da MS <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> dos regimes alimentares para Suínos para o Ensaio Repiso de Tomate .....	27
Gráfico 2 – Análise de variância relativa à digestibilidade da MO <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> dos regimes alimentares para Suínos para o Ensaio Repiso de Tomate .....	27
Gráfico 3 – Análise de variância relativa à digestibilidade da PB <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> dos regimes alimentares para Suínos para o Ensaio Repiso de Tomate .....	27
Gráfico 4 – Análise de variância relativa à digestibilidade da MS <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> dos regimes alimentares para Coelhos para o Ensaio Repiso de Tomate .....	33
Gráfico 5 – Análise de variância relativa à digestibilidade da MO <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> dos regimes alimentares para Coelhos para o Ensaio Repiso de Tomate .....	33
Gráfico 6 – Análise de variância relativa à digestibilidade da PB <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> dos regimes alimentares para Coelhos para o Ensaio Repiso de Tomate .....	34
Gráfico 7 – Análise de variância relativa à digestibilidade da NDF <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> dos regimes alimentares para Coelhos para o Ensaio Repiso de Tomate.....	34
Gráfico 8 – Análise de variância relativa à digestibilidade da ADF <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> dos regimes alimentares para Coelhos para o Ensaio Repiso de Tomate.....	34
Gráfico 9 – Análise de variância relativa à digestibilidade da MS <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> dos regimes alimentares para Coelhos para o Ensaio com <i>Brachiaria</i> .....	39
Gráfico 10 – Análise de variância relativa à digestibilidade da MO <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> dos regimes alimentares para Coelhos para o Ensaio com <i>Brachiaria</i> .....	39
Gráfico 11 – Análise de variância relativa à digestibilidade da PB <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> dos regimes alimentares para Coelhos para o Ensaio com <i>Brachiaria</i> .....	39
Gráfico 12 – Análise de variância relativa à digestibilidade da NDF <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> dos regimes alimentares para Coelhos para o Ensaio com <i>Brachiaria</i> .....	39
Gráfico 13 – Análise de variância relativa à digestibilidade da NDF <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> dos regimes alimentares para Coelhos para o Ensaio com <i>Brachiaria</i> .....	40

## **Lista de Abreviaturas**

ADF – Fibra ácida detergente  
ADL – Lenhina ácida detergente  
APES – Sistema de avaliação de pressão automatizado (técnica de produção de gás)  
CMV – Complexo mineral e vitamínico  
CP – Crude Protein  
CUD – Coeficiente de utilização digestiva  
CUDMS – Coeficiente de utilização digestiva da Matéria Seca  
CUDMO – Coeficiente de utilização digestiva da Matéria Orgânica  
CUDPB – Coeficiente de utilização digestiva da Proteína Bruta  
CUDNDF – Coeficiente de utilização digestiva da Fibra em detergente neutro  
CUDADF – Coeficiente de utilização digestiva da Fibra ácida detergente  
CV – coeficiente de variação  
dE – Digestibilidade da energia  
dMO – Digestibilidade da Matéria Orgânica  
DM – Dry matter  
DP – Desvio padrão da média  
DPR – Desvio padrão residual  
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético  
GB – Gordura Bruta  
GTP – Técnica de produção de gás  
MO – Matéria Orgânica  
MS – Matéria Seca  
N – Número de observações/ amostras  
NDF – Fibra em detergente neutro  
OM – Organic matter  
PB – Proteína Bruta  
RT – Repiso de Tomate  
 $r^2$  – Regressão linear  
SAS – Statistical Analysis System  
SMV – Suplemento mineral vitamínico

## 1. Introdução Geral

### 1.1. Enquadramento do Tema

A produção animal tem apresentado um progresso contínuo, fruto da contribuição científica e tecnológica, das áreas de nutrição e de melhoramento genético. Entretanto, para que o potencial máximo dos animais seja alcançado, é importante a constante atualização das exigências nutricionais, dos valores de composição dos alimentos e dos programas de alimentação usados, uma vez que a utilização digestiva influencia diretamente a *performance* zootécnica.

A realização de estudos *in vivo* é cada vez mais exigente em recursos materiais, humanos e em tempo, e para que exista uma efetiva evolução nesta matéria impõem-se vários estudos recorrendo a diferentes metodologias.

Assim, e exatamente por esse motivo, desde há muitos anos que se pondera a possibilidade de utilização de métodos de digestibilidade *in vitro*, dado que, a sua utilização poderá permitir uma considerável poupança de tempo.

A primeira técnica de digestibilidade *in vitro* foi proposta por Tilley e Terry, em 1963, para os ruminantes, com o objetivo de simular as condições do processo digestivo, com atmosfera anaeróbica, temperatura de incubação constante e pH ótimo.

Esta técnica foi adaptada e aplicada aos suínos em 1991, por Boisen e Eggum, tendo sofrido algumas alterações ao longo dos anos.

Os métodos de digestibilidade *in vitro* também foram aplicados aos coelhos, tendo sido desenvolvidas três técnicas diferentes para predizer a digestibilidade dos regimes. A primeira designada por “Sistema Multienzimático” descrita por Ramos e Carabaño (1996), baseada em Boisen (1991), a segunda designada por “Sistema Inóculo Cecal” descrita por Fernández-Carmona *et al.* (1993) baseado em métodos desenvolvidos para os ruminantes e suínos e, por último, o “Sistema Inóculo Fecal” de procedimento muito semelhante ao anterior. (Pascual, Cervera e Fernández-Carmona, 2000).

O presente estudo irá comparar os resultados da digestibilidade *in vitro* com os resultados obtidos para a digestibilidade *in vivo*, em dietas alimentares com o mesmo teor de fibra e de proteína, em duas espécies, designadamente, suínos e coelhos, e ainda mais quatro regimes, para os coelhos, com progressiva substituição por um alimento, a planta *Brachiaria*, correspondendo a um aumento progressivo do teor de fibra do regime alimentar.

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. Processo digestivo

O objetivo da digestibilidade *in vitro* é simular a digestão realizada pelos animais, *in vivo*, levantando a necessidade de compreender essa mesma digestão, para que a sua reprodução seja o mais idêntica possível.

A transformação dos alimentos é uma parte integrante de todo o processo digestivo, sendo que as transformações químicas e as degradações enzimáticas permitem ao animal usufruir da maior quantidade e qualidade possível dos nutrientes contidos nos alimentos (Lewis & Southern, 2001).

O trato digestivo pode ser considerado como um tubo que se estende da boca ao ânus, compreendendo a boca, faringe, estômago e intestino delgado e grosso, cuja função é a de preensão, ingestão, trituração, digestão e absorção de alimentos, e a de eliminação de resíduos sólidos (McDonald, Edwards, Greenhalgh & Morgan, 2002).

A digestão é o processo de transformação, por hidrólise enzimática, de moléculas de grande tamanho, em unidades de menor dimensão para que possam ser absorvidas e utilizadas pelas células.

O trato gastrointestinal é a parte do organismo onde ocorre a ingestão, digestão e absorção dos nutrientes. Em relação aos componentes dos alimentos que não são absorvidos, os mesmos são eliminados através das fezes.

O movimento do conteúdo intestinal ao longo do trato é produzido pelas contrações, involuntárias, do músculo circular da parede intestinal.

O intestino delgado, que inclui o duodeno, o jejuno e o íleo, é o principal local de absorção dos nutrientes – a superfície disponível para absorção é ampliada grandemente pela existência de vilosidades. (McDonald *et al.* 2002)

Como base na descrição do aparelho digestivo e respetiva digestão temos o Porco.

### 2.1.1. Suínos

Os suínos possuem um sistema digestivo relativamente pequeno, com baixa capacidade de armazenamento, mas com uma elevada eficiência digestiva dos alimentos.

A digestão inicia-se na boca, onde a mastigação tem como objetivo dividir o alimento em partículas menores e misturá-lo com a saliva. A saliva é formada por água, mucina, sais inorgânicos e a enzima salivar, ou ptialina (enzima esta que atua sobre os hidratos de carbono, iniciando a sua degradação).

No estômago, existem secreções gástricas que contêm enzimas proteolíticas segregadas sob a forma de zimógenos e que são ativadas no meio ácido do conteúdo estomacal. Inicia-se aqui a digestão dos prótidos pela ação das pepsinas, pepsinogénio, cuja acidez dos fluidos transforma-o em pepsina, e atua na degradação da proteína.

Relativamente à digestão intestinal, esta é resultado da ação do suco pancreático, da ação da bÍlis e suco entérico. A digestão no intestino delgado ocorre em meio ligeiramente alcalino, que protege a mucosa intestinal da agressão do suco gástrico que entra no duodeno, enquanto que a bÍlis e as secreções pancreáticas vão decompor os alimentos, de forma a serem absorvidos pelas paredes intestinais (Lewis & Southern, 2001).

Existem três grupos de enzimas digestivas de grande atividade no suco pancreático, nomeadamente, amilase (para amido), proteases (para proteínas) e lípases (para lípidos).

A maior parte da digestão e absorção dos nutrientes ocorre no intestino delgado, onde o duodeno é essencialmente um local de mistura e neutralização, e o jejuno um local de absorção dos nutrientes.

Por sua vez, a digestão no intestino grosso realiza-se por meio de algumas enzimas precedentes do intestino delgado e através da ação das enzimas microbiana – microrganismos que habitam principalmente no ceco. Estes microrganismos atuam sobre os constituintes alimentares não digeridos e/ ou absorvidos, em particular os constituintes das paredes vegetais e algumas proteínas que não tenham sido digeridas no intestino delgado, sendo através do intestino grosso que estes animais conseguem aproveitar os produtos finais da fermentação microbiana. (Lewis *et al.*, 2001)

O trato gastrointestinal dos suínos tem presente uma microflora essencial para a sua saúde, nutrição e performance (Pieper, Janczyk, Schumann & Souffrant, 2006).

A microflora interfere na digestão dos alimentos, em particular dos constituintes das paredes vegetais e fornece nutrientes, produtos essenciais, como vitaminas (vitamina K, B12, tiamina, riboflavina e piridoxina) e participa na regulação do metabolismo mineral. Para além de interferir na digestão, é também responsável pela manutenção da normal morfologia intestinal,

pela estimulação da resposta imunitária, assim como, pela proteção contra a colonização de microrganismos patogénicos (Lojewska & Pieszka, 2011).

Uma parte importante da digestão é a digestão dos constituintes da parede vegetal.

#### ▪ **Digestão dos constituintes da parede vegetal**

Os principais constituintes da fibra alimentar estão presentes na parede celular vegetal, sendo esta definida por um conjunto de Lenhina e Polissacáridos Não Amiláceos (PNA), que não é digerido pelas secreções endógenas do aparelho digestivo (Low, 1993). A fibra alimentar, pode considerar-se dividida em fibra insolúvel e fibra solúvel, sendo a primeira composta essencialmente por hemiceluloses, celulose e lenhina (Van Soest, Robertson, & Lewis, 1991), caracterizando-se pela sua resistência à hidrólise química e enzimática.

A utilização da fibra na alimentação dos monogástricos tem que ser ponderada, devendo-se considerar vários aspetos como, a fonte de fibra (o alimento), nível de lenhificação, valores de inclusão, grau de processamento, composição físico-química do regime alimentar, dado que, qualquer destes valores é variável consoante a espécie, estado fisiológico, idade e até ambiente em que se encontra o animal. Quando consideramos todos estes fatores, a digestibilidade da fibra pode variar entre 0 e 97% (Rénat, 1978, citado por Ferreira, Fontés & Fernandes, 1999).

Segundo Low (1993) quanto maior é a percentagem de fibra do regime alimentar, menor será a digestibilidade aparente total.

#### **2.1.2. Coelhos**

Em termos gerais, o processo digestivo nos coelhos é semelhante ao dos suínos apresentando, no entanto, algumas particularidades resultantes da prática de cecotrofia e das características dos regimes alimentares.

O coelho também possui características específicas, resultantes da adaptação da ingestão de alimentos ricos em fibra (Gidenne, 1996; citado por Falcão-e-Cunha, 2000).

A digestão tem início na boca, seguida do esófago e de um estômago simples, dividido em dois sacos cuja capacidade é variável com o tipo de alimentação, sendo de cerca de 0,1 a 0,25 litros no animal adulto (Gidenne, 1987, citado por Falcão-e-Cunha, 2000)

Os órgãos de maior volume são o estômago e o ceco, correspondendo, respetivamente a 34% e 49% do volume total do trato digestivo (Carabaño, Piquer, Menoyo & Badiola, 2010).

A fisiologia digestiva deste animal é afetada pela composição química dos regimes alimentares, verificando-se um trânsito digestivo mais rápido quando alimentados com regimes ricos em fibra (observado por Gidenne *et al.*, 1991; Gidenne *et al.*, 1992; citado por Falcão-e-Cunha, 2000).

A digestão é mais rápida no intestino delgado, local onde ocorre a maior absorção de nutrientes e o seu pH geralmente é neutro. No estômago e ceco, a digestão poderá ser mais prolongada, mas no total a digestão completa poderá variar entre as 9 e 30 horas, dependendo dos regimes administrados e o pH (Carabaño *et al.*, 2010).

Uma das particularidades da digestão deste animal, como já referido anteriormente, é a prática de cecotrofia. Os coelhos apresentam dois tipos de fezes diferentes na sua constituição, as fezes duras e as fezes moles. Os cecotrofos ou fezes moles que o coelho consome diretamente do ânus permanecem intactas no estômago entre 3 a 6 horas, favorecendo a ação das bactérias (Falcão-e-Cunha, 2000).

Esta prática permite um melhor aproveitamento dos nutrientes, uma vez que, os que não foram absorvidos retornam ao aparelho digestivo, tornando-se um complemento da alimentação. Durante o período de cecotrofia os animais limitam-se na ingestão de alimento. Os cecotrofos fornecem energia, bem como entre 15% a 20% da proteína necessária e aminoácidos essenciais (Gidenne *et al.*, 2010, citado por Carabaño *et al.*, 2010).

### **3. Quantificação da digestão**

#### **3.1. Medição da digestibilidade aparente**

Com o objetivo de ter uma noção mais exata do equilíbrio dietético do animal, deve estabelecer-se uma relação entre as necessidades nutricionais do animal e aquilo que o alimento consumido lhe proporciona (Dove & Mayes, 1991). No entanto, só é possível se forem conhecidas as quantidades de ingestão e a digestibilidade dos alimentos.

Para além da medição da digestibilidade *in vitro* também poderá existir medição da digestão *in vivo*. Esta medição é realizada de forma semelhante entre as espécies descritas, suínos e coelhos.

A digestibilidade pode ser calculada diretamente a partir do conhecimento da ingestão e da excreção fecal, como demonstrado na expressão descrita abaixo.

$$\text{Digestibilidade (\%)} = \left[ \frac{(\text{quantidade ingerida} - \text{quantidade excretada})}{\text{Quantidade ingerida}} \right] \times 100$$

### 3.1.1 Fatores que afetam a digestibilidade dos alimentos

A digestibilidade de um alimento ou de um regime constitui um dos principais parâmetros nutricionais determinantes do processo produtivo dos animais. Em termos de terminologia, a digestão consiste num conjunto de alterações físicas, químicas e enzimáticas de uma fração do alimento ou regime alimentar, durante a sua passagem pelo trato digestivo.

Vários fatores podem afetar a digestibilidade dos alimentos, podendo esses fatores ser inerentes ao animal – espécie – e ao alimento, em particular a sua composição.

Fatores não inerentes ao alimento podem ser a espécie animal, idade e estado de saúde em que o animal se encontra. Para além destes fatores mais triviais, podemos também considerar o processamento da matéria-prima em questão, que pode levar à diminuição dos fatores anti nutricionais ou o efeito da temperatura, no caso da desidratação das leguminosas, por exemplo.

Fatores inerentes ao alimento podem ser considerados a composição química do alimento, o regime alimentar em que está incluído, bem como, a quantidade de inclusão do próprio alimento, devido à saturação ou não de determinado nutriente.

## 4. Métodos de estimativa da digestibilidade *in vitro*

Há muito que se tenta inovar e avançar nos estudos relativos à *performance* zootécnica e determinação do valor nutricional dos alimentos, fazendo novas conquistas laboratoriais e de estimativa da digestibilidade e/ ou valor nutritivo dos alimentos, tentando assim minimizar tempo e custos inerentes à produção animal.

A *performance* zootécnica/ animal depende diretamente do consumo e aproveitamento dos alimentos por parte da espécie. Segundo Berchielli *et al.* (2005), a quantidade total de nutrientes absorvidos na dieta é um dos fatores que mais vai influenciar a resposta animal na produção, sendo, dessa forma, importante a determinação da qualidade nutricional dos alimentos.

A melhor forma de determinar o valor nutricional dos alimentos é conseguida através da análise da composição química e dos coeficientes de digestibilidade dos mesmos, sendo que



com essa finalidade foram desenvolvidas inúmeras metodologias, entre as quais o método de predição da digestibilidade *in vitro*, nomeadamente de animais monogástricos.

Os resultados da composição química e da digestibilidade dos alimentos determinam o valor nutritivo dos mesmos, ou seja, para que o alimento tenha um bom valor nutricional tem que ter, além de um elevado teor de nutrientes, uma boa digestibilidade.

Como as determinações *in vivo* são pouco céleres e muito dispendiosas, tem sido dedicada muita atenção ao desenvolvimento de processos *in vitro*.

Para simular a digestibilidade é necessário considerar toda a atividade enzimática no trato digestivo que, por vezes, pode ter grande impacto na digestão total, e ser um obstáculo na execução do método em plena concordância com a digestibilidade real dos animais.

A capacidade de digestão do animal pode ser modificada por diversos estímulos, como por exemplo, regime alimentar, doenças, genética, entre outros. Deste modo, as enzimas gástricas terão que se adaptar a qualquer situação. Impondo ao método reproduzido a máxima “versatilidade” possível, sem perder a eficiência.

Esta evidência de que vários fatores afetam a digestibilidade *in vivo*, torna improvável a sua reprodução na íntegra quando simulada em laboratório, e aumenta assim a necessidade de diferenciar e especificar os métodos *in vitro*, para situações singulares de forma a obter resultados relevantes e positivos em cada determinação específica, como da MS, Fibra, entre outros.

O primeiro método publicado sobre a digestibilidade *in vitro* foi proposto por Tilley e Terry (1963), com um estudo sobre a digestão dos microrganismos no rúmen. Esta técnica difundiu-se, tendo sido largamente utilizada para aferir a digestibilidade *in vivo*. Atualmente, este método tornou-se no mais propagado e utilizado em estudos de nutrição de ruminantes.

Contudo, este método promissor apresenta restrições de ordem prática, como por exemplo, excesso de tempo e trabalho despendido, necessidade de mão-de-obra especializada e infra-estruturas laboratoriais específicas.

#### **4.1. Os métodos *in vitro* nos monogástricos**

Como já referido anteriormente, o primeiro método a ser desenvolvido e publicado foi proposto por Tilley e Terry, em 1963, método este de determinação da digestibilidade *in vitro* para ruminantes.

Este método difundiu-se e serviu de base para o desenvolvimento e adaptação de novos métodos de digestibilidade *in vitro* para outras espécies animais, bem como para diferentes objetivos. Um dos estudos foi publicado, em 1991, por Boisen e Eggum, em que esquematizaram diversos métodos mais específicos e menos gerais.

Alguns dos métodos citados por Boisen e Eggum (1991), são os seguintes:

- **Método de Diálise da Célula:**

- O objetivo deste método é estudar a influência de fatores da digestão da proteína quando existe a inibição do produto final, utilizando o princípio de remover os produtos de baixo peso molecular, obtidos devido à digestão enzimática, através da diálise.

- **Métodos Colorimétricos:**

- Este método detém como objetivo prever a disponibilidade ou digestibilidade do amido, principalmente em alimentos processados, utilizando a coloração na glucose e maltose libertadas a partir do amido.

- **Métodos de “filtração”:**

- O objetivo destes métodos é prever a digestibilidade ao nível ileal e/ ou fecal, baseados na utilização de produtos insolúveis recolhidos após a filtração. Estes métodos têm como particularidade a existência de especificações para as diversas situações, ou seja, neste contexto, os métodos de “filtração” são uma categoria de métodos singulares e estão divididos em três grupos: “Sistemas de um passo”, “Sistemas de dois passos” e “Sistemas de três passos”.

- **Sistemas de “Um passo”:**

- **Fluidos intestinais**

- Consiste numa única incubação com três diferentes inóculos, fluidos do duodeno incubados durante 12h, ou fluidos ileais ou extratos fecais incubados durante 48h, descrito por Lowgren *et al.* (1989), citados por Boisen & Eggum (1991). Este método

foi reconhecido oficialmente pela Associação Oficial de Analistas Químicos, em 1984, uma vez que apresentou uma boa correlação entre os resultados *in vivo* e *in vitro* para as aves.

- **Sistemas de “Dois passos”:**

- **Fluidos Pepsino-Jejunais**

- Comporta duas incubações, a digestão pela pepsina por 4h, seguida por mais 4h de digestão com fluidos jejunais de porco, que foi desenvolvido por Furuya *et al.* (1979). Segundo Boisen e Eggum (1991), Dierick *et al.*, em 1985, compararam os resultados obtidos a partir do método pepsino-jejunal, com os resultados para dois outros métodos de dois passos, onde ambos incluem a pepsina no primeiro passo, mas, no segundo passo, um utiliza pancreatina e o outro utiliza pronase. Os resultados obtiveram uma correlação próxima, indicando que o fluido jejunal pode ser substituído por uma pancreatina apropriada sem reduzir a exatidão.

- **Pepsina pancreatina**

- Este método compreende duas incubações, com a amostra do alimento a ser incubada com pepsina durante 6h, sendo seguida pela incubação com a pancreatina por 18h. Método aplicado por Boisen & Fernández (1991), para execução da digestibilidade *in vitro* em suínos.

- **Sistemas de “Três passos”:**

- **Pepsina pancreatina – fluidos ruminais**

- O método foi desenvolvido por Tilley & Terry (1963), para ruminantes, utilizando fluidos ruminais como inóculo, e foi aplicado por Vervaeke *et al.* Em 1979, para estudar a fermentação da matéria orgânica nos suínos. Esta incubação é realizada posteriormente à pré-incubação das dietas com pepsina e pancreatina.

- **Pepsina pancreatina – enzimas de degradação de fibra**

- Segundo Boisen *et al.* (1991), Metz & Van der Meer (1985), descrevem este método *in vitro*, como um método concebido para predizer a digestibilidade fecal da matéria orgânica depois de consecutivas incubações de pepsina, pancreatina e celulase.

De entre os métodos descritos por Boisen e Eggum, em 1991, os métodos denominados por “Filtração” aparentaram ser os melhores indicadores da digestibilidade ileal e fecal nos animais monogástricos, levando a serem estudados detalhadamente.

Em sequência, o método pepsina-pancreatina obteve resultados muito próximos para uma variedade de rações tanto para ratos quanto para porcos, comparando a digestibilidade *in vitro* da proteína e a digestibilidade fecal, apesar de não terem sido publicados resultados.

Os efeitos de todos os parâmetros relevantes desse mesmo método foram investigados cuidadosamente, com a finalidade de se obter um método válido para todos os alimentos comumente utilizados em dietas, evidenciando assim o potencial desta técnica que, anos mais tarde, sofreu, através Boisen e Fernández (1997), algumas alterações de forma a se tornar mais específico, para prever a digestibilidade total da energia nos alimentos e rações para suínos.

Ramos e Carabaño em 1992, descreveram o método para os coelhos com base no método desenvolvido por Boisen em 1991.

## **4.2. Os diversos métodos nos Monogástricos**

### **4.2.1. Método com validade geral**

Foram realizados diversos estudos para concluir que tamanho e quantidade de amostra, ou tempo de incubação seria necessário para simular de forma mais semelhante a digestibilidade. Um estudo muito conclusivo nesses pontos foi realizado por Boisen e Fernández, em 1997.

Boisen e Fernández, em 1997, estudaram os pormenores do método proposto, em 1991, por Boisen e Eggum, de forma a que este pudesse ser considerado fiável para inúmeros alimentos

e regimes alimentares para suínos ou, por outras palavras, tornando-se um método com validade geral.

Como mencionado: “O método tem de ser ajustado para que o potencial máximo da digestibilidade das frações dos nutrientes seja medido de forma independente da sua concentração na ração” [Citado por Boisen & Fernández, pág. 278, *Animal Feed Science Technology* 68 (1997)].

Todos os detalhes da digestibilidade simulada *in vitro* são importantes nos resultados obtidos, com tal, os efeitos de todos os parâmetros relevantes nas condições de incubação da digestibilidade *in vitro*, como por exemplo o tempo de incubação, pH da digestão, entre outros, também foram investigados minuciosamente por Boisen e Fernández (1997). Nesse estudo, os autores concluíram que a digestibilidade *in vitro* é menor quanto maior for o tamanho das partículas, sendo que os resultados para as amostras moídas com crivo superior a 1mm foram menos reprodutíveis, apesar de variáveis para os diversos alimentos, bem como que o efeito da utilização de 1g em vez de 0,5g de amostra também foi investigado, concluindo que a digestibilidade de alimentos ricos em proteína é subestimada quando se usa 1g de amostra. Para obter esta conclusão Boisen *et al.* (1997) realizaram um estudo com 31 alimentos diferentes.

Para além do tamanho e quantidade de amostra, também chegaram a outras conclusões, como: ao adicionar-se 0,5ml de solução clorofenicol após a adição de pepsina evita-se o crescimento microbiano; o efeito do EDTA está relacionado com o elevado teor de minerais, sendo necessária a sua adição devido à precipitação provocada com o Viscozyme, levando assim à sua atenuação; o efeito da agitação contínua é especialmente importante para alimentos ricos em amido e evita que a amostra sedimente durante o processo digestivo.

#### **4.2.2. Variabilidade inter e intra-laboratorial**

Outra necessidade imposta foi garantir que o método teria a maior fiabilidade possível, de forma a que fosse reprodutível dentro e fora do próprio laboratório.

Um estudo bastante referenciado nesse aspeto foi realizado por Carabaño, Nicodemus, Gracia, Trocino, Pascual, Falcão-e-Cunha e Maertens, em 2008. E, para esse estudo foram utilizados 4 regimes completos e para 4 alimentos específicos (bagaço de trigo, ervilha, bagaço de girassol e cevada), as análises foram realizadas em 4 laboratórios diferentes, em triplicado, e em 3 períodos diferentes com 1 mês de intervalo cada um. Os parâmetros avaliados foram os seguintes:

Repetibilidade – variabilidade intra-série dentro de cada laboratório;

Reprodutibilidade – variabilidade intra-série entre os laboratórios;

Confiabilidade – variabilidade ao longo do tempo dentro de cada laboratório.

Segundo os resultados obtidos por Carabaño *et al.* (2008) pôde-se concluir que, em geral, nem a repetibilidade nem a reprodutibilidade dos resultados foram constantes ao longo dos três períodos, mas foram melhorando com a experiência do operador, sendo que no último período os valores foram mais favoráveis.

Também concluíram que a maior variabilidade dos resultados é observada entre laboratórios (reprodutibilidade). Por exemplo, para a digestibilidade *in vitro* da MS, o desvio padrão dentro dos laboratórios (repetibilidade) é duas vezes maior que entre laboratórios, 46% e 28% respectivamente.

A variabilidade observada ao longo do tempo, ou seja, a Confiabilidade, apresentou resultados menos favoráveis que para a repetibilidade, em que o coeficiente de variação é, respectivamente, 1,77 e 1,43; estando os resultados em concordância com estudo realizado anteriormente por Ramos e Carabaño (1996) e Pascual *et al.* (2000).

Esta técnica apresentou também melhores resultados, para a fiabilidade do que as técnicas que utilizam inóculos fecais ou ileais, ou até mesmo da análise química das fibras, sugerindo elevada estabilidade ao tempo por parte das enzimas utilizadas neste método.

As diferenças observadas entre os valores médios de todas as amostras eram relativamente baixas, tanto entre laboratórios como entre diferentes períodos de tempo (0,6% em média).

Em suma, apesar da repetibilidade ter obtido resultados mais favoráveis para dietas completas do que para alimentos específicos (denotando alguns problemas do método para alguns alimentos específicos e sugerindo uma possível alteração no mesmo), os resultados gerais indicaram que a metodologia *in vitro* fornece repetibilidade e reprodutibilidade adequada para ser utilizada nos mais variados laboratórios sem necessitar de alguma adaptação, sempre que se trate da mesma espécie animal, concordando assim com o autor Pascual *et al.* (2000) que afirmou que a repetibilidade do método é fidedigna.

#### **4.2.3. GTP – Técnica de produção de gás**

Uma outra metodologia *in vitro* desenvolvida para estimar a digestibilidade dos alimentos para os animais baseia-se na técnica de produção de gás.

A técnica de produção de gás tem sido principalmente utilizada para avaliar o valor nutritivo de alimentos utilizados para os ruminantes (Menke & Steingass, 1988, citado por Nizza, Stango, Di Meo & Carabro, 2003), apesar de já ter sido proposta também para Suínos (Williams *et al.* 1995, citado por Nizza *et al.* 2003). Mais recentemente foi proposta também para os coelhos, utilizando como inóculo conteúdo fresco do ceco.

No ensaio com coelhos documentado por Nizza *et al.* (2003), a cinética da fermentação foi medida com a GTP utilizando um novo sistema automático, o APES (Sistema de avaliação de pressão automatizado, desenvolvido por Davies *et al.*, 2000). O APES consiste em conectar 48 frascos de cultura de 120 ml a interruptores sensíveis à pressão e válvulas solenoides.

Os resultados desse estudo apontaram para a possibilidade de utilização da técnica de produção de gás para prever a MS e MO com precisão moderada, entre 60 a 70% de variabilidade, sendo que a maior dificuldade encontrada foi a uniformidade da amostra do conteúdo do ceco dos coelhos, sendo proposto a utilização de conteúdo congelado ao invés de fresco (Williams *et al.*, 1998; citado por Nizza *et al.*, 2003).

## **5. Procedimentos experimentais/ Materiais e Métodos**

Este trabalho teve por objetivo comparar a digestibilidade *in vivo* com a digestibilidade *in vitro* utilizando diferentes regimes alimentares. A fase experimental da digestibilidade *in vitro* decorreu no Laboratório Pais de Azevedo, no Instituto Superior de Agronomia, e os resultados da digestibilidade *in vivo* foram obtidos através de trabalhos realizados por outros alunos no mesmo instituto, Lourinhã (2013); Alves (2013); Gomes (2013). Para se comparar os dados de forma mais equitativa, desenvolveu-se o trabalho experimental efetuando oito repetições (no mínimo) de cada determinação de digestibilidade *in vitro*, igualizando da melhor forma o número de animais utilizados nos mesmos.

### **5.1. Regimes**

A composição centesimal dos regimes alimentares em estudo para ambas as espécies está representada nas tabelas 1, 3 e 5, a composição química nas tabelas 2, 4 e 6. Estas dietas haviam sido distribuídas anteriormente a leitões (Alves, 2013) e a coelhos (Lourinhã, 2013; Gomes, 2013) e a digestibilidade das várias frações determinadas.



### 5.1.1. Regime dos Suínos com Repiso de Tomate

Formularam-se 4 regimes, um regime com inclusão de sêmea de trigo e óleo de soja (P1), um regime com inclusão de sêmea de trigo e banha (P2), um regime com inclusão de repiso de tomate e óleo de soja (P3) e um regime com inclusão de repiso de tomate e banha (P4).

**Tabela 1** – Composição centesimal dos 4 regimes alimentares para suínos com inclusão de repiso de tomate e/ ou banha, em %

Composição	Sêmea de trigo		Repiso de tomate	
	Óleo soja (P1)	Banha (P2)	Óleo soja (P3)	Banha (P4)
Trigo	55,0	55,0	57,0	57,0
Sêmea de trigo	7,0	7,0	0,0	0,0
Repiso de tomate	0,0	0,0	5,0	5,0
Bagaço de soja	25,0	25,0	25,0	25,0
Soro de leite	5,0	5,0	5,0	5,0
Óleo de soja	5,0	0,0	5,0	0,0
Banha	0,0	5,0	0,0	5,0
L lisina	0,5	0,5	0,5	0,5
DL-metionina	0,1	0,1	0,1	0,1
L- treonina	0,1	0,1	0,1	0,1
Carbonato de cálcio	0,7	0,7	0,7	0,7
Fosfato bicalcico	0,9	0,9	0,9	0,9
Cloreto de sódio	0,2	0,2	0,2	0,2
CMV <sub>1</sub>	0,5	0,5	0,5	0,5

[1 – CMV corresponde: Complexo mineral e vitamínico. Composição por kg de alimento: Vit. A: 25000 UI; Vit. D3: 2000 UI; Vit. E: 20 UI; Vit. C: 200mg; Vit. B1: 1, 5 mg; Vit. B2: 5 mg; Vit. B3:30 mg; Vit. B5: 15 mg; Vit. B6: 2,5 mg; Vit. B9: 0, 5 mg; Vit. B12: 0, 03 mg; Vit. K3: 1mg; Vit. H2: 80 mg; colina: 300 mg; I (iodeto de potássio): 1 mg; Mn (óxido de manganês): 50 mg; Fe (carbonato ferroso): 120mg; Zn (óxido de zinco): 140 mg; Cu (sulfato cúprico): 160 mg; Se (selenito de sódio): 0,3 mg; Co (carbonato de cobalto): 0.5mg.]

**Tabela 2** – Composição química dos 4 regimes alimentares para suínos com inclusão de repiso de tomate e/ ou banha, em % de MS

Composição	Sêmea de trigo	Repiso de tomate		
	Óleo soja (P1)	Banha (P2)	Óleo soja (P3)	Banha (P4)
<b>MS</b>	88,44	89,13	89,59	89,90
<b>CINZA</b>	5,24	7,71	6,39	8,65
<b>PB</b>	20,70	19,32	21,16	20,33
<b>GB</b>	6,39	6,40	6,28	7,01
<b>NDF</b>	12,87	13,84	12,51	12,96
<b>ADF</b>	3,51	3,73	4,94	4,62
<b>ADL</b>	1,11	2,09	1,98	2,85
<b>Hemicelulose<sub>2</sub></b>	9,36	10,11	7,57	8,34
<b>Celulose<sub>2</sub></b>	2,41	1,64	2,98	1,77

(2 – Hemicelulose = NDF-ADF; Celulose = ADF-ADL)

### 5.1.2. Regime dos Coelhos com Repiso de Tomate

Formularam-se 4 regimes alimentares: um regime controlo (RCTR), um regime com inclusão de 6% de repiso de tomate (RRT6), um regime com inclusão de 12% de repiso de tomate (RRT12) por substituição de igual quantidade de luzerna e um regime com inclusão de 0,14% de vitamina E (RVITE).

**Tabela 3** – Composição centesimal de 4 regimes distribuídos aos coelhos com inclusão de repiso de tomate ou vit. E, em %

Composição	Com Repiso de Tomate			
	Controlo (RCTR)	Vitamina E (RVITE)	6% de RT (RRT6)	12% de RT (RRT12)
Trigo	18,0	18,0	18,0	18,0
Semente de linho R/MAX LIN 70 ®	20,0	20,0	20,0	20,0
Luzerna	22,2	22,0	16,0	10,0
Repiso de Tomate	0,0	0,0	6,0	12,0
Polpa de beterraba	8,9	8,8	8,6	8,3
Bagaço de soja	5,0	5,0	5,0	5,0
Bagaço de girassol	10,0	10,0	10,0	10,0
Sêmea de trigo	10,0	10,0	10,0	10,0
Palha	5,0	5,0	5,0	5,0
Lisina	0,16	0,16	0,2	0,25
AAS	0,02	0,02	0,04	0,05
Sal	0,5	0,5	0,5	0,5
Premix	0,2	0,2	0,2	0,2
Carbonato de Cálcio	0,2	0,2	0,5	0,7
Vitamina E	0,0	0,14	0,0	0,0

**Tabela 4** – Composição química dos 4 regimes distribuídos aos coelhos com inclusão de repiso de tomate ou vit. E, em % de MS

<b>Composição</b>	<b>Com Repiso de Tomate</b>			
	<b>Controlo (RCTR)</b>	<b>Vitamina E (RVITE)</b>	<b>6% de RT (RRT6)</b>	<b>12% de RT (RRT12)</b>
<b>MS</b>	89,5	90,0	87,7	88,2
<b>MO</b>	93,6	93,9	94,6	93,9
<b>GB</b>	8,2	8,6	9,0	9,2
<b>PB</b>	18,6	18,4	18,8	18,6
<b>NDF</b>	37,7	38,6	37,2	36,4
<b>ADF</b>	15,2	15,3	15,1	12,9
<b>ADL</b>	5,4	6,3	7,2	8,3
<b>Hemicelulose<sub>2</sub></b>	22,5	23,3	22,1	23,5
<b>Celulose<sub>2</sub></b>	9,8	9,0	7,9	4,6

(2 – Hemicelulose = NDF-ADF; Celulose = ADF-ADL)

### 5.1.3. Regime dos Coelhos com a planta *Brachiaria*

Formularam-se 4 regimes alimentares: um regime controlo (CTRL), um regime com inclusão de 10% de *Brachiaria* (CK10), um regime com inclusão de 20% de *Brachiaria* (CK20) e um regime com inclusão de 30% de *Brachiaria* (CK30).

**Tabela 5** – Composição centesimal do regime controlo e dos regimes alimentares para coelhos em crescimento com a inclusão de proporções crescentes de *Brachiaria*, em %

Composição	Sem <i>Brachiaria</i>	Com <i>Brachiaria</i>		
	Controlo (CTRL)	10% (CK10)	20% (CK20)	30% (CK30)
Milho	25,0			
Sêmea de trigo	15,0			
Bagaço de soja	11,0			
Bagaço de girassol	11,0	89,0	79,0	69,0
Luzerna desidratada	25,0			
Palha de trigo	8,0			
Óleo vegetal	4,0			
Brachiaria	0,0	10,0	20,0	30,0
Sal	0,5	0,5	0,5	0,5
Premix	0,2	0,2	0,2	0,2
Carbonato de Cálcio	0,27	0,27	0,27	0,27
Vitamina E	0,03	0,03	0,03	0,03

**Tabela 6** – Composição química do regime controlo e dos regimes alimentares para coelhos em crescimento com a inclusão de proporções crescentes de *Brachiaria*, em % de MS

Composição	Sem Brachiaria	Com Brachiaria		
	Controlo (CTRL)	10% (CK10)	20% (CK20)	30% (CK30)
MS	91,3	91,7	92,0	91,3
Cinza	7,3	7,5	7,9	8,2
MO	92,7	92,5	92,1	91,8
PB	14,6	13,7	12,4	11,8
NDF	36,8	39,0	44,3	49,2
ADF	18,1	19,9	22,8	24,8
ADL	4,1	3,9	4,2	3,9
Hemicelulose <sub>2</sub>	18,7	19,1	21,5	24,4
Celulose <sub>2</sub>	14,0	16,0	18,6	20,9

(2 – Hemicelulose = NDF-ADF; Celulose = ADF-ADL)

## 5.2. Protocolo Experimental

### 5.2.1. Digestibilidade *in vitro* para Suínos

A digestibilidade *in vitro* dos regimes alimentares dos suínos foi efetuada com base na adaptação do método de Regmi, Ferguson e Zijlstra (2009).

Pesou-se 1g de amostra para um Balão de Erlenmeyer Pirex de 150ml e adicionou-se a cada frasco uma barrinha magnética, 25ml de solução tampão fosfato (0,1M pH 6) e 10ml de uma solução de HCl a 0,2M. Posteriormente a amostra e a solução foram misturadas com uma agitação magnética suave no agitador Labinco.

O pH foi medido e ajustado a pH 2 com a solução de HCl a 1M ou com a solução NaOH a 1M. Depois de se ajustar o pH, juntou-se 1ml de um preparado de solução de pepsina fresca (25mg de pepsina/ml de solução) – pepsina P-7000, Sigma-Aldrich – e 0,5ml de clorofenicol (0,5g/ 100ml de etanol). Por fim, misturou-se suavemente com agitação magnética. Os balões foram fechados com Parafilm e as amostras incubadas no banho-maria, Sfl 108,3, a 39°C durante 2h.

Após esta incubação, juntou-se 10ml de solução tampão fosfato (0,2M, pH 6,8) e 5ml de solução de NaOH a 0,6M a cada balão Erlenmeyer, de modo a obter um pH de 6,8. As

amostras e as soluções foram misturadas cuidadosamente com agitação magnética e o pH foi medido e ajustado a pH 6,8 com as soluções 1M de HCl ou 1M de OHNa.

De seguida, adicionou-se 1ml de solução de pancreatina fresca (preparada recentemente) - 100mg de pancreatina/ ml de solução – (pancreatina de porco grau VI, Sigma n 1750) e misturou-se com agitação magnética. Os balões foram novamente fechados com Parafilm e as amostras incubadas a 39°C durante 4h.

Depois desta segunda incubação juntou-se 10ml de solução de EDTA a 0,2M e ajustou-se o pH a 4,8 com solução de ácido acético a 30%, mantendo sempre a agitação magnética suave com o agitador Labinco, e adicionou-se 0,5ml de Viscozyme. Os balões foram novamente fechados com Parafilm e as amostras incubadas a 39°C durante 18h.

Após a terceira incubação parou-se a digestão enzimática com 5ml de solução de ácido sulfasalicílico a 20% e manteve-se o frasco à temperatura ambiente durante 30 minutos para facilitar a precipitação das proteínas solúveis não digeridas.

Posteriormente, o resíduo indigestível foi recolhido na unidade de filtração do sistema Fibertec Trade Ray DS, transferindo a amostra para um cadinho (nº2) seco e pré pesado. A seguir à filtração o resíduo foi lavado com água destilada várias vezes e com etanol e acetona (50ml) no Quitasato Nysil.

Seguidamente, o resíduo foi seco a 103°C até peso constante (24 horas) na estufa Binder, sendo determinada assim a Matéria Seca.

O mesmo processo foi seguido com um frasco sem amostra de modo a corrigir o resíduo devido aos reagentes (branco).

### **5.2.2. Digestibilidade *in vitro* para Coelhos**

Adaptado de acordo com o Método de M. Ramos (1992) e utilizado por EGRAN (muito idêntico ao método anteriormente enunciado)

Pesou-se 1 g de amostra +/- 0,1mg e colocou-se num Balão de Erlenmeyer Pirex de 150ml. Juntou-se a cada frasco, uma barrinha magnética, 25ml de solução tampão fosfato (0,1M pH 6) e 10ml de uma solução de HCl a 0,2M. Posteriormente a amostra e a solução foram misturadas com uma agitação magnética suave no agitador Labinco.

O pH foi medido e ajustado a pH 2 com a solução de HCl a 1M ou com a solução NaOH a 1M. Depois de se ajustar o pH, juntou-se 1ml de um preparado de solução de pepsina fresca (25mg de pepsina/ ml de 0,2M HCl) - pepsina de porco 2000 FIP – Unidades / g de proteína Merck n 7190 – e misturou-se com agitação magnética. Os balões foram fechados com Parafilm e as amostras incubadas em banho-maria, Sfl 108,3 a 40°C durante 1h e 30min.

Depois desta incubação, juntou-se 10ml de solução tampão fosfato (0,2M, pH 6,8) e 5ml de solução de NaOH a 0,6 M a cada balão Erlenmeyer, de modo a obter um pH de 6,8. As

amostras e as soluções foram misturadas cuidadosamente com agitação magnética e o pH foi medido e ajustado a pH 6,8 com as soluções 1M de HCl ou 1M de NaOH.

Após este ajuste, adicionou-se 1ml de solução de pancreatina fresca (preparada recentemente) - 100 mg de pancreatina /ml de solução tampão fosfato a pH 6,8 – (pancreatina de porco grau VI, Sigma n 1750) e misturou-se suavemente com agitação magnética. Os balões foram novamente fechados com Parafilm e as amostras incubadas a 40°C durante 3h e 30min.

Depois desta segunda incubação, o pH foi ajustado a 4,8 por adição de ácido acético e após o ajuste, adicionou-se 0,5ml de Viscosyme e misturou-se com agitação magnética. Os balões foram fechados e as amostras incubadas em banho-maria a 40°C por 16 horas – durante a noite.

Posteriormente à incubação o resíduo indigestível foi recolhido na unidade de filtração do sistema Fibertec Trade Ray DS, transferindo a amostra para um cadinho (nº2) seco e pré pesado. Depois da filtração o resíduo foi lavado com água destilada várias vezes e com etanol e acetona (50ml) no Quitasato Nysil.

Seguidamente, o resíduo foi seco a 103°C até peso constante (24 horas) na estufa Binder, sendo determinada assim a Matéria Seca.

O mesmo processo foi seguido com um frasco sem amostra de modo a corrigir o resíduo devido aos reagentes (branco).

Sendo as diferenças, quando comparado com o método aplicado às dietas para dos suínos, o tempo de incubação, e a não utilização de EDTA e de ácido sulfasalicílico.

### **5.3. Análises químicas específicas**

Para determinarmos a utilização digestiva dos alimentos *in vitro* e realizarmos as análises químicas (MS, MO, PB, NDF, ADF, ADL) utilizámos regimes alimentares digeridos de forma simulada no laboratório.

Para qualquer determinação as amostras foram moídas com crivo de 1 mm tornando-as mais uniformes e facilitando o manuseamento laboratorial das mesmas.

#### **5.3.1. Determinação da Matéria Seca**

A determinação da Matéria Seca do resíduo digerido *in vitro* antecede qualquer outra determinação química, isto é, após a digestibilidade *in vitro* o conteúdo vai à estufa secar a 103,5°; no mínimo durante 6h, e depois pesa-se, obtendo assim a percentagem de matéria seca após a digestibilidade.



### **5.3.2. Determinação da Cinza/ Matéria Orgânica**

A cinza foi determinada após a incineração da amostra na mufla, a 550°, durante 6h, sendo muitas vezes aconselhável deixar a noite de forma a permanecer mais tempo na mufla.

A Matéria Orgânica foi determinada através da subtração da Cinza à Matéria Seca anteriormente obtida.

### **5.3.3. Determinação da Fibra**

A determinação de NDF, ADF e ADL foi realizada de acordo com o método de Van Soest *et al.* (1991), através da utilização do sistema de Fibertec.

### **5.3.4. Determinação da Proteína Bruta**

A proteína bruta foi determinada através do Método de Kjeldahl, e multiplicado o azoto obtido no método por 6,25; assumindo assim que toda proteína contém 16% de azoto.

## **5.4. Análise estatística**

Para a análise estatística dos dados utilizou-se o programa *Statistical Analysis System* (SAS, 1991). A estatística descritiva foi efetuada pelo procedimento “UNIVARIATE”, as matrizes de correlação calculadas pelo procedimento “CORR”. As análises de variância foram efetuadas pelo procedimento “GLM”, utilizando-se o efeito da composição dos regimes, o método de estimativa da digestibilidade (*in vivo*, *in vitro*) e as suas interações como fatores de variação.

## **6. Resultados e Discussão**

Os resultados obtidos apresentam-se organizados segundo a espécie e regime alimentar: Suínos e os Regimes do ensaio com inclusão de Repiso de Tomate; Coelhos e os Regimes do ensaio com inclusão de Repiso de Tomate; Coelhos e os Regimes do ensaio com inclusão de *Brachiaria*.

## 6.1. Suínos

Na tabela 7 apresentam-se os dados da aplicação da estatística descritiva aos resultados da digestibilidade *in vivo* e *in vitro* da MS, MO e PB dos quatro regimes alimentares distribuídos no ensaio com leitões.

**Tabela 7** – Estatística descritiva relativa a análise da digestibilidade dos alimentos para Suínos para o Ensaio Repiso de Tomate

		<i>in vivo</i>					<i>in vitro</i>				
	Regime	N	Média	DPR	CV	DP	N	Média	DPR	CV	DP
<b>MS</b>	<b>P1</b>	10	86,29	1,87	2,16	0,59	9	79,10	1,38	1,75	0,46
	<b>P2</b>	9	87,73	1,17	1,33	0,39	8	80,72	1,83	2,27	0,65
	<b>P3</b>	10	87,97	4,04	4,59	1,28	9	78,25	2,41	3,08	0,80
	<b>P4</b>	10	87,54	1,61	1,83	0,51	8	81,27	1,35	1,67	0,48
<b>MO</b>	<b>P1</b>	10	88,15	2,51	2,85	0,79	9	78,01	1,45	1,87	0,48
	<b>P2</b>	9	87,41	1,21	1,39	0,40	8	79,80	1,92	2,40	0,68
	<b>P3</b>	10	87,69	1,01	1,15	0,32	9	77,13	2,56	3,31	0,85
	<b>P4</b>	10	88,85	2,23	2,51	0,71	8	80,26	1,39	1,73	0,49
<b>PB</b>	<b>P1</b>	10	86,80	2,79	3,22	0,88	10	91,16	1,29	1,41	0,41
	<b>P2</b>	9	88,10	1,87	2,12	0,62	17	90,87	2,23	2,45	0,54
	<b>P3</b>	10	87,58	2,80	3,19	0,88	18	89,24	1,61	1,80	0,38
	<b>P4</b>	10	86,44	1,83	2,12	0,58	12	91,06	2,18	2,39	0,63

(Onde, P1 – regime alimentar com inclusão de sêmea de trigo e óleo de soja; P2 – regime alimentar com inclusão de sêmea de trigo e banha; P3 – regime alimentar com inclusão de repiso de tomate e óleo de soja; P4 – regime alimentar com inclusão de repiso de tomate e banha; e DP – desvio padrão da média; CV – Coeficiente de Variação; DPR – desvio padrão residual; N – número de observações.)

Ao comparar-se os valores da digestibilidade *in vitro* da MS e MO com os da digestibilidade *in vivo* observa-se que os primeiros são inferiores, mas a dispersão dos resultados, avaliada pelo desvio padrão, ocorre em ambos os tipos de análise.

Em média, as digestibilidades da MS e MO *in vivo* foram superiores cerca de 30% relativamente aos valores obtidos *in vitro*. Ao contrário do que nós registámos, Pujol & Torrallardona (2007), ao compararem a digestibilidade *in vitro* com a *in vivo* da MS e da MO da cevada verificaram que os valores *in vitro* eram superiores aos obtidos *in vivo*. A justificação apresentada pelos autores anteriores de o método *in vitro* proporcionar uma maior degradação da fibra do que o verificado a nível do tubo digestivo dos porcos não foi observada nos resultados presentes.

Também os resultados obtidos por Boisen & Fernández (1997), em que compararam os valores da digestibilidade da MO *in vitro* e *in vivo* de 33 matérias primas diferentes para suínos, vão no mesmo sentido dos autores anteriormente referidos. Embora o método seguido no presente trabalho tenha sido muito semelhante ao utilizado por Boisen & Fernández (1997), o facto de estarmos a comparar estes métodos em regimes alimentares para leitões e não em alimentos simples pode, em parte, explicar as diferenças por nós observadas relativamente aos resultados apresentados pelos autores mencionados. A digestibilidade da proteína bruta obtida pela utilização do método *in vitro* foi sempre superior aos valores obtidos *in vivo*. Esta diferença foi cerca de 4%. A não existência de compostos azotados endógenos no método *in vitro* poderá explicar as diferenças dos valores observados.

Na tabela 8 apresenta-se a matriz de correlação entre os resultados da digestibilidade da MS, MO e PB obtidas *in vivo* e *in vitro*. Pode analisar-se esta matriz observando i) as correlações entre os valores *in vitro*; ii) as correlações entre os valores *in vivo*; iii) as correlações entre os valores *in vitro* e *in vivo*.

**Tabela 8** – Matriz de correlação dos valores de digestibilidade *in vivo* e *in vitro* dos regimes alimentares para Suínos para o ensaio Repiso de Tomate

	CUDMSi	CUDMOi	CUDPBi	CUDMS	CUDMO	CUDPB
CUDMSi	1	0,9992	0,3083	<b>0,2626</b>	0,1082	0,0672
		***	0,0761			
CUDMOi		1	0,3055	0,2612	<b>0,0935</b>	0,0673
			0,0789			
CUDPBi			1	0,0365	0,28605	<b>0,1606</b>
CUDMS				1	0,17162	0,7180
					***	
CUDMO					1	0,2410
CUDPB						1

(Onde CUDMSi, CUDMOi, CUDPBi representam os coeficientes de utilização digestiva determinados *in vitro*; e CUDMS, CUDMO, CUDPB representam os coeficientes de utilização digestiva determinados *in vivo*.)

Assim, observa-se uma correlação altamente significativa entre as os valores da digestibilidade da MS e da MO determinadas *in vitro*, no entanto esta correlação não se verifica nas determinações realizadas nos animais. Apesar de normalmente se verificar uma correlação positiva e elevada entre as digestibilidades da MS e da MO.

As correlações entre os valores de digestibilidade *in vitro* vão num sentido lógico, isto é, a um aumento da digestibilidade da MS corresponde um aumento da digestibilidade da MO e da PB.

Nas correlações entre os valores obtidos *in vivo*, observa-se uma correlação elevada ( $P < 0,0001$ ) entre os resultados das digestibilidades da MS e da PB, indicando que a variação da digestibilidade da fração PB tem um peso muito grande nas variações da digestibilidade da MS.

O facto de não existirem correlações significativas entre os valores *in vitro* e *in vivo* permite concluir que não podemos assumir os valores *in vitro* para estimativa direta dos valores *in vivo*.

Na tabela 9 apresenta-se a análise de variância dos valores de digestibilidade utilizando três fatores: a natureza da fibra, a natureza da gordura e o método.

**Tabela 9** – Análise de Variância relativa aos valores de digestibilidade *in vitro* e *in vitro* dos regimes alimentares para Suínos para o Ensaio Repiso de Tomate

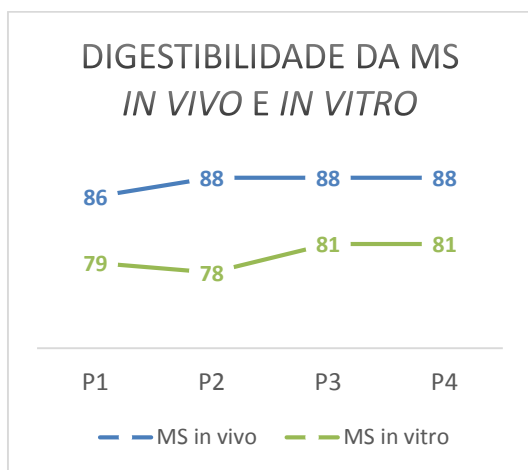
	in vivo				in vitro									
Fibra	1	1	2	2	1	1	2	2						
Gordura	1	2	1	2	1	2	1	2	Fibra	Gordura	Met	FxG	FxM	GxM
CUDMS	86	88	88	88	79	78	81	81	0,008	0,568	<0,0001	0,818	0,083	0,388
CUDMO	88	88	87	89	78	77	80	80	0,004	0,755	<0,0001	0,072	0,013	0,432
CUDPB	87	88	88	86	91	89	91	91	0,341	0,144	<0,0001	0,851	0,440	0,642

(Onde, Met – método; FxG – Fibra vs. Gordura; FxM – Fibra vs. Método; GxM – Gordura vs. Método)

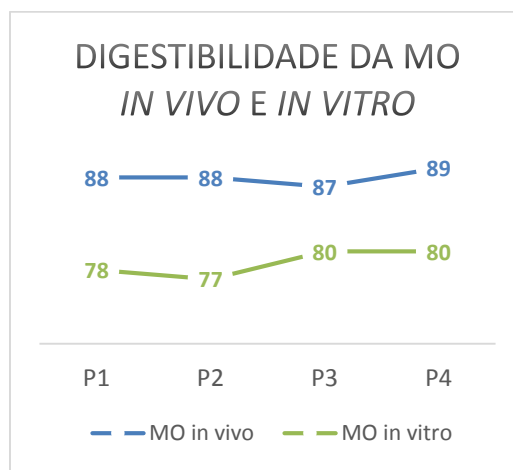
Observa-se um efeito altamente significativo do método em todas as determinações, sem, no entanto, se registarem interações entre o método e a natureza da gordura. No caso das interações entre o método e a natureza da fibra – sêmea de trigo ou repiso de tomate - há apenas uma interação ( $P < 0,05$ ) entre o tipo de método e a digestibilidade da MO.

Para melhor compreender o efeito do método nos valores da digestibilidade apresentamos os gráficos 1, 2 e 3.

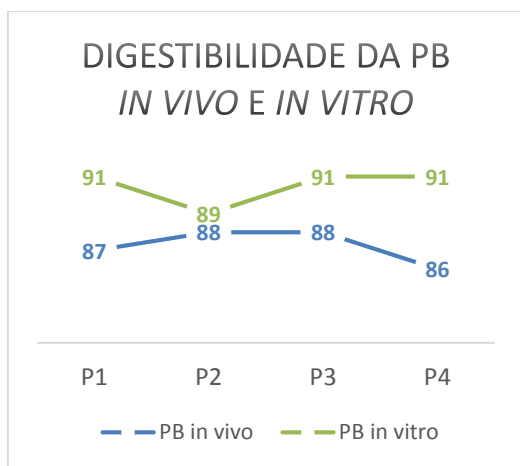
**Gráfico 1** – Análise de variância relativa à digestibilidade da MS *in vivo* e *in vitro* dos regimes alimentares para Suínos para o Ensaio Repiso de Tomate



**Gráfico 2** – Análise de variância relativa à digestibilidade da MO *in vivo* e *in vitro* dos regimes alimentares para Suínos para o Ensaio Repiso de Tomate



**Gráfico 3** – Análise de variância relativa à digestibilidade da PB *in vivo* e *in vitro* dos regimes alimentares para Suínos para o Ensaio Repiso de Tomate



Os valores das digestibilidades de MS, da MO e da PB determinadas *in vivo* e *in vitro* são praticamente paralelos demonstrando a não existência de interações entre o método e os regimes em estudo.

Boisen e Fernández, em 1997, defenderam que o método descrito para a digestibilidade determinada *in vitro* combinado com um método semelhante para a previsão da digestibilidade *in vivo*, ao nível ileal, iria permitir a previsão da degradação pós-ileal da fibra (principalmente polissacáridos não amiláceos). E concluiu que a digestibilidade da fibra depende em grande escala da natureza da fibra.

O objetivo da análise de variância apresentado na tabela 9 foi testar se o método *in vitro* permitia chegar às mesmas conclusões do método *in vivo* no que diz respeito aos efeitos da fibra e da gordura. Só houve uma interação significativa (FXM) em relação ao CUDMO o que significa que embora os valores sejam diferentes em termos absolutos o sentido dos efeitos é o mesmo para quase todos os CUD's.

## 6.2. Coelhos – Ensaio com Repiso de Tomate

Na tabela 10 apresentam-se os dados da aplicação da estatística descritiva aos resultados da digestibilidade *in vivo* e *in vitro* da MS, MO, PB, NDF e ADF dos quatro regimes alimentares distribuídos no ensaio com coelhos.

**Tabela 10** – Estatística descritiva relativa a análise da digestibilidade dos alimentos para Coelhos para o Ensaio Repiso de Tomate

		<i>in vivo</i>					<i>in vitro</i>				
	Regime	N	Média	DPR	CV	DP	N	Média	DPR	CV	DP
<b>MS</b>	<b>RCTR</b>	8	66,56	1,58	2,37	0,01	8	67,79	0,52	0,76	0,18
	<b>RVITE</b>	11	64,75	2,34	3,62	0,01	10	65,77	3,57	5,43	1,13
	<b>RRT6</b>	12	65,53	1,53	2,33	0,00	8	69,69	0,81	1,17	0,29
	<b>RRT12</b>	9	68,21	2,19	3,21	0,01	8	70,64	0,56	0,79	0,20
<b>MO</b>	<b>RCTR</b>	8	67,48	1,65	2,44	0,01	8	67,27	0,53	0,78	0,19
	<b>RVITE</b>	11	65,55	2,25	3,43	0,01	10	65,02	3,68	5,65	1,16
	<b>RRT6</b>	12	65,43	1,47	2,21	0,00	8	69,08	0,90	1,30	0,32
	<b>RRT12</b>	9	69,92	4,64	6,64	0,02	8	69,66	0,57	0,83	0,20
<b>PB</b>	<b>RCTR</b>	8	80,23	1,73	2,16	0,01	12	88,17	1,48	1,68	0,43
	<b>RVITE</b>	11	79,96	2,43	3,04	0,01	12	87,38	1,52	1,74	0,44
	<b>RRT6</b>	12	78,01	1,75	2,25	0,01	12	86,79	3,64	4,20	1,05
	<b>RRT12</b>	9	78,32	3,12	3,99	0,01	10	83,52	3,21	3,84	1,02
<b>NDF</b>	<b>RCTR</b>	8	35,19	3,45	9,85	0,01	10	21,24	2,01	9,78	0,01
	<b>RVITE</b>	11	33,25	4,83	14,52	0,01	8	21,67	1,12	5,38	0,00
	<b>RRT6</b>	12	34,21	2,56	7,48	0,01	10	15,92	2,16	13,54	0,01
	<b>RRT12</b>	9	37,31	3,53	9,47	0,01	10	24,45	4,35	17,75	0,01
<b>ADF</b>	<b>RCTR</b>	8	27,76	4,31	15,56	0,01	10	7,95	4,44	55,91	0,01
	<b>RVITE</b>	11	31,38	14,97	47,71	0,05	8	12,65	1,63	12,86	0,01
	<b>RRT6</b>	12	28,74	3,36	11,70	0,01	10	15,92	2,16	13,54	0,01
	<b>RRT12</b>	9	30,99	4,01	13,14	0,01	10	15,38	1,47	9,57	0,00

(Onde, RCTR – regime alimentar de controlo; VITE – regime alimentar com inclusão de 0,14% de vitamina E; RRT6 – regime alimentar com inclusão de 6% de repiso de tomate; RRT12 – regime alimentar com inclusão de 12% de repiso de tomate;

e DP – desvio padrão da média; CV – Coeficiente de Variação; DPR – desvio padrão residual; N – número de observações)

Neste ensaio com regimes alimentares para coelhos em crescimento – engorda, as médias dos valores das digestibilidades *in vivo* e *in vitro* foram mais próximas, do que os observados com os regimes dos leitões, denotando-se pouca diferença entre valores *in vivo* e *in vitro*, com cerca de 2% a mais para os últimos. Com exceção do caso da proteína, onde, mais uma vez,

os valores foram mais elevados para a digestibilidade *in vitro*, cerca de 10%. Observa-se que o CV apresenta valores variáveis para a mesma variável – MS, MO ou PB – com os regimes alimentares independentemente das determinações *in vivo* ou *in vitro*. Esta variabilidade do CV, não seria expectável já que as determinações *in vitro* serão teoricamente mais controladas que as *in vivo*. No entanto esta situação também se registou com os regimes alimentares dos leitões.

Por sua vez, os valores de digestibilidade da NDF e da ADF apresentaram registos *in vitro* cerca de 60 e 50%, respetivamente, inferiores aos observados *in vivo*; o CV foi da mesma ordem com a utilização de ambos os métodos. A possibilidade de que a natureza das enzimas e/ ou o tempo de atuação não terem sido os mais adequados poderá explicar as diferenças. Quando comparamos com os resultados obtidos nos restantes estudos – leitões e coelhos com introdução de *Brachiaria* – verificamos que este foi o que aproximou mais os valores *in vivo* e *in vitro*. Pode ser devido à menor influência do método na MS e MO [contrariamente ao observado por Pascual, J. J., Cervera, C. & Fernández-Carmona, J. (2000) ] e também devido à origem da fibra nestes regimes alimentares.



Na tabela 11 apresenta-se a matriz de correlação entre os resultados da digestibilidade da MS, MO, PB, NDF e ADF obtidas *in vivo* e *in vitro*. Do mesmo modo que no capítulo anterior, a análise pode ser realizada comparando i) as correlações entre os valores *in vitro*; ii) as correlações entre os valores *in vivo*; iii) as correlações entre os valores *in vitro* e *in vivo*.

**Tabela 11** – Matriz de correlação dos valores de digestibilidade *in vivo* e *in vitro* dos regimes alimentares para Coelhos para o ensaio Repiso de Tomate

	CUDMSi	CUDMOi	CUDPBi	CUDNDFi	CUDADFi	CUDMS	CUDMO	CUDPB	CUDNDF	CUDADF
CUDMSi	1	0,9993 ***	-0,2653	-0,1054	0,3157	<b>-0,24263</b>	-0,23088	-0,49239	-0,32226	-0,287
CUDMOi		1	-0,2616	-0,1004	0,3047	-0,24992	<b>-0,23711</b>	-0,488	-0,33007	-0,2935
CUDPBi			1	-0,22315	-0,32382	-0,13944	-0,30605	<b>0,03261</b>	-0,06889	-0,04237
CUDNDFi				1	0,08107	0,21781	0,24739	0,09964	<b>0,09609</b>	-0,00242
CUDADFi					1	-0,09659	-0,03061	-0,32217	-0,20313	<b>-0,18694</b>
CUDMS						1	0,9432 ***	0,5844 ***	0,9047 ***	0,59477 ***
CUDMO							1	0,55566	0,8199	0,52529
CUDPB								1	0,49734	0,42094
CUDNDF									1	0,0068
CUDADF										1

(Onde CUDMSi,CUDMOi, CUDPBi, CUDNDFi, CUDADFi representam os coeficientes de utilização digestiva determinados *in vitro*; e CUDMS,CUDMO, CUDPB, CUDNDF, CUDADF representam os coeficientes de utilização digestiva determinados *in vivo*.)

Nesta matriz observa-se que nos valores de digestibilidade *in vitro* há apenas uma correlação significativa ( $P < 0,001$ ) a que se verifica entre os valores da digestibilidade da MS e da MO. O mesmo observa-se com os valores *in vivo*. Neste caso, as correlações significativas ocorrem em todas as digestibilidades das frações consideradas. As correlações *in vivo* são muito mais lógicas, mostrando, por exemplo, que a digestibilidade da MS aumenta quando aumenta a digestibilidade dos seus componentes - da MO, PB, NDF e ADF. Há uma coerência dos valores *in vivo* que não ocorre nos valores *in vitro*.

As correlações *in vitro* – *in vitro* mostram que a estimativa da digestibilidade da MS é em grande parte determinada pela digestibilidade *in vitro* da MO. Nos valores *in vitro* as correlações mostram ainda que a digestibilidade da PB está mais correlacionada com a digestibilidade *in vitro* do ADF ( $P < 0,05$ ) mas como a correlação é negativa significa que

quando aumenta a digestibilidade do ADF diminui a digestibilidade da PB, não sendo este facto expectável.

O facto das correlações *in vitro* – *in vivo* não serem significativas traduz que em termos absolutos não podemos utilizar os valores *in vitro* como estimativa direta dos valores *in vivo*.

Na tabela 12 apresenta-se a análise de variância dos valores de digestibilidade utilizando dois fatores: o regime e o método.

**Tabela 12** – Análise de Variância relativa aos valores de digestibilidade *in vitro* e *in vitro* dos regimes alimentares para Coelhos para o Ensaio Repiso de Tomate

regimes	in vivo				in vitro				reg	met	r x m
	RCTR	VITE	RRT6	RRT12	RCTR	VITE	RRT6	RRT12			
CUDMS	66,68	64,7	64,83	67,35	67,5	65,8	69,5	70	0,0011	0,0002	0,07
CUDMO	67	65,5	68,9	69,3	65,7	65,1	69,1	69,3	0,0013	ns	ns
CUDPB	80,47	79,92	77,57	77,74	88,17	87,38	86,79	83,52	***	***	ns
CUDNDF	35,63	33,22	32,88	35,6	21,24	21,66	15,92	24,49	0,0008	***	ns
CUDADF	28,2	31,42	27,3	29,12	7,95	12,65	15,92	15,38	0,0363	***	ns

(Onde, RCTR – regime alimentar de controlo; VITE – regime alimentar com inclusão de 0,14% de vitamina E; RRT6 – regime alimentar com inclusão de 6% de repiso de tomate; RRT12 – regime alimentar com inclusão de 12% de repiso de tomate; e reg – regime; met – método; r x m – regime vs. método.)

A análise de variância dos resultados de digestibilidade das várias frações analíticas das dietas dos coelhos *in vivo* e *in vitro* considerando como fatores o regime alimentar e o método (tabela 12) demonstra que, com exceção da digestibilidade da MO, há um efeito altamente significativo do método. para todas as outras determinações, embora não se registem interações significativas entre os fatores em estudo, como se pode ver nos gráficos 4 a 8.

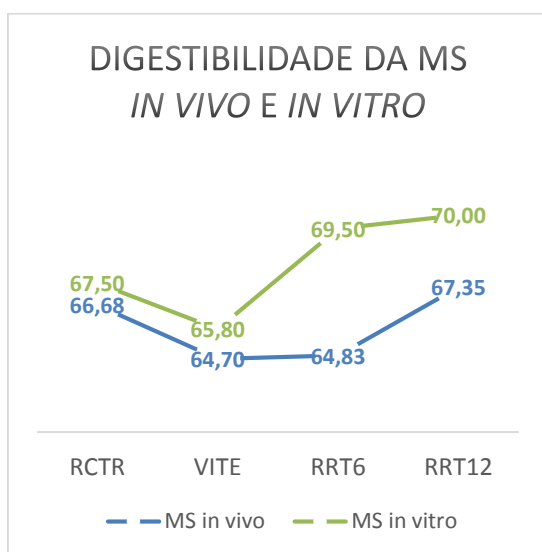
Relativamente à diferenciação entre métodos (*in vivo* e *in vitro*) os resultados obtidos indicam uma variância quase inexistente para MS e MO. Nas restantes variáveis existe uma diferenciação notória, principalmente para NDF e ADF, levando mais uma vez a concluir que o método de digestibilidade *in vitro* não pode ser aplicado para analisar o CUD da fibra.

O regime teve uma grande influência nos valores obtidos para CUDPB, uma vez que a disponibilidade origem da PB influencia a sua utilização digestiva.

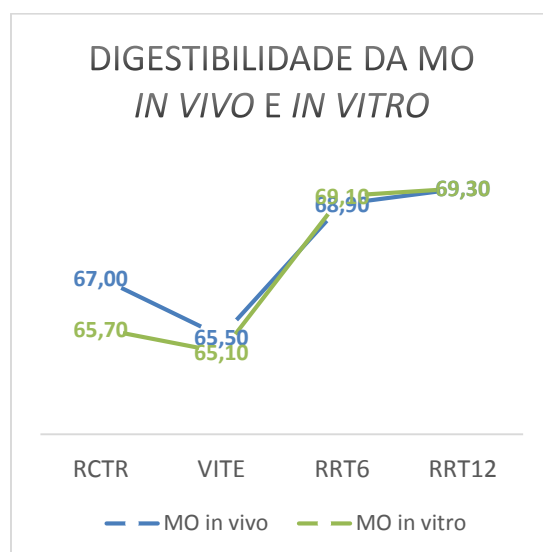
As diferenças observadas na digestibilidade *in vivo* e *in vitro* das frações da fibra poderá levar-nos a questionar se o tempo de ação do complexo enzimático na digestibilidade *in vitro* foi o adequado.

No entanto, em trabalhos realizados por outros autores, como por exemplo, Villamide, Carabaño, Maertens, Pascual, Gidenne, Falcao-e-Cunha & Xiccato (2009), que utilizaram um tempo de ação e uma concentração muito semelhante às nossas também não consideraram o método um bom preditor para a digestibilidade das frações de fibra.

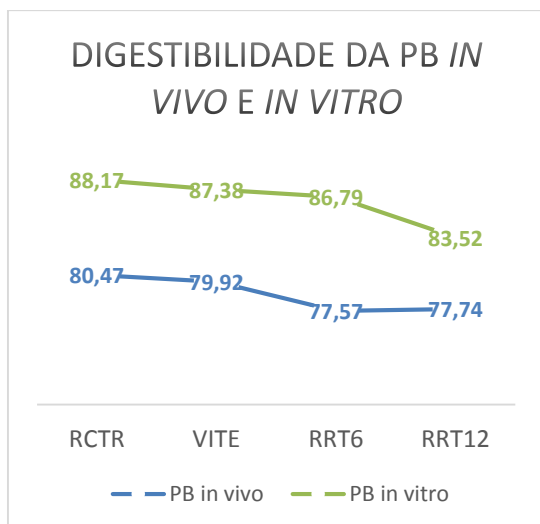
**Gráfico 4** – Análise de variância relativa à digestibilidade da MS *in vivo* e *in vitro* dos regimes alimentares para Coelhos para o Ensaio Repiso de Tomate



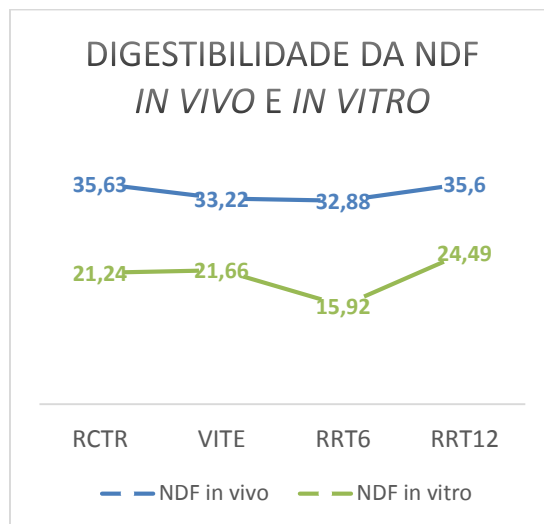
**Gráfico 5** – Análise de variância relativa à digestibilidade da MO *in vivo* e *in vitro* dos regimes alimentares para Coelhos para o Ensaio Repiso de Tomate



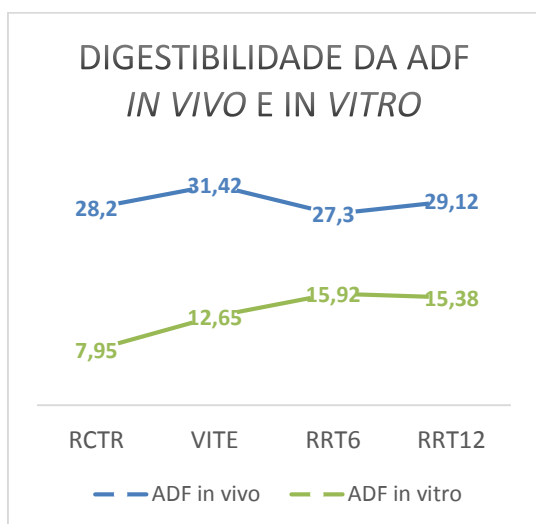
**Gráfico 6** – Análise de variância relativa à digestibilidade da PB *in vivo* e *in vitro* dos regimes alimentares para Coelhos para o Ensaio Repiso de Tomate



**Gráfico 7** – Análise de variância relativa à digestibilidade da NDF *in vivo* e *in vitro* dos regimes alimentares para Coelhos para o Ensaio Repiso de Tomate



**Gráfico 8** – Análise de variância relativa à digestibilidade da ADF *in vivo* e *in vitro* dos regimes alimentares para Coelhos para o Ensaio Repiso de Tomate



A visualização gráfica dos valores das digestibilidades determinadas pelos dois métodos indica um paralelismo em praticamente todas as frações.

Assim, apesar dos resultados de digestibilidade *in vitro* não permitirem determinar a digestibilidade *in vivo*, podem ser úteis, nestas condições experimentais, para testar o efeito dos regimes.

### 6.3. Coelhos – Ensaio com a Planta *Brachiaria*

Na tabela 13 apresentam-se os dados da aplicação da estatística descritiva aos resultados da digestibilidade *in vivo* e *in vitro* da MS, MO, PB, NDF e ADF dos quatro regimes alimentares distribuídos no ensaio com coelhos e a planta *Brachiaria*.

**Tabela 13** – Estatística descritiva relativa a análise da digestibilidade dos alimentos para Coelhos para o Ensaio *Brachiaria*

		<i>in vivo</i>					<i>in vitro</i>				
	Regime	N	Média	DPR	CV	DP	N	Média	DPR	CV	DP
<b>MS</b>	<b>CTRL</b>	9	67,14	2,94	4,37	0,98	10	65,96	2,36	3,58	0,75
	<b>CK10</b>	9	65,04	3,46	5,32	1,15	10	62,90	2,35	3,74	0,74
	<b>CK20</b>	12	61,01	1,94	3,18	0,56	10	57,57	2,26	3,93	0,71
	<b>CK30</b>	9	58,56	3,40	5,80	1,13	10	53,58	2,53	4,72	0,80
<b>MO</b>	<b>CTRL</b>	9	67,33	2,9	4,31	0,97	10	64,47	2,48	3,84	0,78
	<b>CK10</b>	9	65,18	3,58	5,49	1,19	10	61,47	2,42	3,94	0,77
	<b>CK20</b>	12	61,27	1,91	3,12	0,55	10	56,12	2,36	4,20	0,75
	<b>CK30</b>	9	58,40	3,28	5,61	1,09	10	52,04	2,57	4,94	0,81
<b>PB</b>	<b>CTRL</b>	9	79,22	2,4	3,02	0,80	10	86,86	2,38	2,74	0,75
	<b>CK10</b>	9	80,42	1,92	2,39	0,64	8	88,44	1,29	1,46	0,46
	<b>CK20</b>	12	78,91	2,11	2,67	0,61	8	88,09	1,39	1,58	0,49
	<b>CK30</b>	9	76,71	3,36	4,38	1,12	8	87,76	1,62	1,84	0,57
<b>NDF</b>	<b>CRTL</b>	9	35,47	5,34	15,06	1,78	8	18,56	3,22	17,32	1,14
	<b>CK10</b>	9	32,73	8,02	24,50	2,67	9	15,81	12,11	76,60	4,04
	<b>CK20</b>	12	33,38	2,84	8,52	0,82	9	15,52	2,50	16,08	0,83
	<b>CK30</b>	9	35,96	4,68	13,03	1,56	8	16,89	3,42	20,23	1,21
<b>ADF</b>	<b>CRTL</b>	9	23,85	6,49	27,24	2,16	8	3,60	3,93	109,29	1,39
	<b>CK10</b>	9	23,04	8,99	39,03	3,00	9	4,88	12,39	253,92	4,13
	<b>CK20</b>	12	25,81	4,00	15,49	1,15	9	2,75	4,28	155,59	1,43
	<b>CK30</b>	9	24,93	7,19	28,83	2,40	8	1,97	5,47	277,84	1,93

(Onde, CTRL – regime alimentar controlo; CK10 – regime alimentar com inclusão de 10% de *Brachiaria*; CK20 – regime alimentar com inclusão de 20% de *Brachiaria*; CK30 – regime alimentar com inclusão de 30% de *Brachiaria*;

e DP – desvio padrão da média; CV – Coeficiente de Variação; DPR – desvio padrão residual; N – número de observações.)

Por sua vez, e contrariamente ao observado no ensaio anterior com coelhos com introdução de um regime com repiso de tomate, os valores médios da digestibilidade da MS e MO *in vitro* são ligeiramente abaixo dos obtidos *in vivo*, cerca de 2%.

A digestibilidade foi progressivamente menor para MS e MO com o aumento de incorporação de *Brachiaria*, devido ao teor de fibra ser mais elevado. A digestibilidade é inversamente proporcional ao teor de fibra do regime, quanto maior for o teor de fibra menor será a digestibilidade global do regime alimentar.

Com já visto anteriormente, para todas as variáveis os valores de CUD *in vitro* são quase sempre mais baixos do que os valores *in vivo*, com exceção da PB, em que se passa o inverso. No caso da PB a digestibilidade *in vitro* ser superior ao *in vivo* resultará de não haver compostos azotados endógenos que neste caso particular, poderiam ser elevados devido ao teor de fibra.

A apresentação da estatística descritiva relativamente à digestibilidade da NDF e da ADF deste ensaio tem apenas como objetivo realçar a pouca credibilidade da aplicação deste processo metodológico como estimativa da digestibilidade *in vivo*, nas nossas condições experimentais. A necessidade da sua adaptação à estimativa da digestibilidade da fibra deverá ser ensaiada e testada em diferentes condições laboratoriais. Na verdade, quer na sua origem (Boisen & Eggum, 1991) quer posteriormente na sua adaptação por Ramos e Carabaño (1992) a coelhos, o objetivo principal da utilização deste método era a estimativa do valor energético e do valor azotado a partir da estimativa da digestibilidade *in vitro* da MS, da MO e da PB, e não a sua utilização na determinação da digestibilidade das frações fibra.

Na tabela 14 apresenta-se a matriz de correlação entre os resultados da digestibilidade da MS, MO, PB, NDF e ADF obtidas *in vivo* e *in vitro*. Do mesmo modo que nos capítulos anteriores, a análise pode ser realizada comparando i) as correlações entre os valores *in vitro*; ii) as correlações entre os valores *in vivo*; iii) as correlações entre os valores *in vitro* e *in vivo*.

**Tabela 14** – Matriz de correlação dos valores de digestibilidade *in vivo* e *in vitro* dos regimes alimentares para Coelhos para o ensaio *Brachiaria*

	CUDMSi	CUDMOi	CUDPBi	CUDNDFi	CUDADFi	CUDMS	CUDMO	CUDPb	CUDNDF	CUDADF
CUDMSi	1	0,9993	-0,1809	0,0842	0,1545	<b>0,7445</b>	0,7413	0,3965	0,0230	-0,0266
	***					***	***	*		
CUDMOi		1	-0,1893	0,0922	0,1645	0,7381	<b>0,7360</b>	0,3920	0,0198	-0,0274
						***	***	*		
CUDPBi			1	-0,1853	-0,2164	-0,1528	-0,1676	<b>0,0280</b>	-0,0961	-0,1361
CUDNDFi				1	0,8725	-0,0296	-0,0395	0,0361	<b>-0,1100</b>	-0,1902
					***					
CUDADFi					1	-0,0112	-0,0204	-0,0088	-0,1632	<b>-0,0167</b>
CUDMS						1	0,9910	0,6728	0,5655	0,4949
							***	***	***	***
CUDMO							1	0,6595	0,5496	0,4704
								***	***	***
CUDPb								1	0,3614	0,4417
									*	**
CUDNDF									1	0,8965
										*
CUDADF										1

(Onde CUDMSi,CUDMOi, CUDPBi, CUDNDFi, CUDADFi representam os coeficientes de utilização digestiva determinados *in vitro*; e CUDMS,CUDMO, CUDPb, CUDNDF, CUDADF representam os coeficientes de utilização digestiva determinados *in vivo*.)

A matriz de correlação apresentada na Tabela 14 pode ser analisada considerando dois pontos de vista: a correlação entre as várias determinações dentro do mesmo método ou a correlação entre os resultados *in vivo* com os *in vitro*.

A elevada correlação entre a digestibilidade da MS e da MO *in vivo* é normal, é reconhecida, desde há muito, a relação estreita entre estas duas determinações e verificada em inúmeros resultados publicados. Observamos também que esta elevada correlação se regista nos valores *in vitro*.

Nos valores *in vivo* registou-se uma correlação altamente significativa entre as digestibilidades da MS e da MO e a digestibilidade da fibra o que está de acordo com o efeito da fibra na digestibilidade global das dietas [Gidenne, T., Garcia, J., Lebas, F. & Licois, D. (2010)]. Este facto é bastante notório, neste ensaio, devido à substituição do regime base por uma erva seca, elevando-se o teor de NDF de cerca de 35% (regime CTRL) para cerca de 50% na MS (regime CK30), sendo a fibra a fração menos digestível do regime.

No entanto, nas determinações *in vitro* não se observaram correlações entre as digestibilidades das frações anteriormente referidas, levando a questionar o método utilizado.

Na tabela 15 apresenta-se a análise de variância dos valores de digestibilidade utilizando dois fatores: o regime e o método.

**Tabela 15** – Análise de Variância relativa aos valores de digestibilidade *in vitro* e *in vivo* dos regimes alimentares para Coelhos para o Ensaio *Brachiaria*

	<i>in vivo</i>				<i>in vitro</i>						
Regimes	CTRL	CK10	CK20	CK30	CTRL	CK10	CK20	CK30	reg	met	r x m
CUDMS	67,10	65,00	61,00	58,00	65,30	62,00	57,00	53,00	***	***	ns
CUDMO	67,00	65,00	61,00	58,00	64,47	61,50	56,10	52,03	***	***	ns
CUDPB	79,20	80,40	78,90	76,70	86,60	88,40	88,10	87,80	0,04	***	ns
CUDNDF	35,00	32,70	33,40	36,00	18,00	15,60	15,30	16,70	0,04	***	ns
CUDADF	23,00	23,00	25,00	25,00	4,00	5,00	3,00	2,00	0,43	***	ns

(Onde, CTRL – regime alimentar controlo; CK10 – regime alimentar com inclusão de 10% de *Brachiaria*; CK20 – regime alimentar com inclusão de 20% de *Brachiaria*; CK30 – regime alimentar com inclusão de 30% de *Brachiaria*;

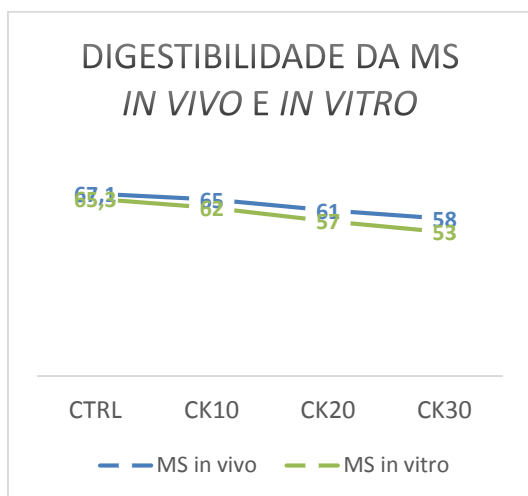
e reg – regime; met – método; r x m – regime vs. método.)

Na Tabela 15 analisámos o efeito do método e do regime nos resultados. Mais uma vez o método tem um efeito altamente significativo ( $P < 0,001$ ) nos resultados embora não ocorram interações significativas entre o método e o regime. Os gráficos 9 a 13 demonstram visualmente esta não interação.

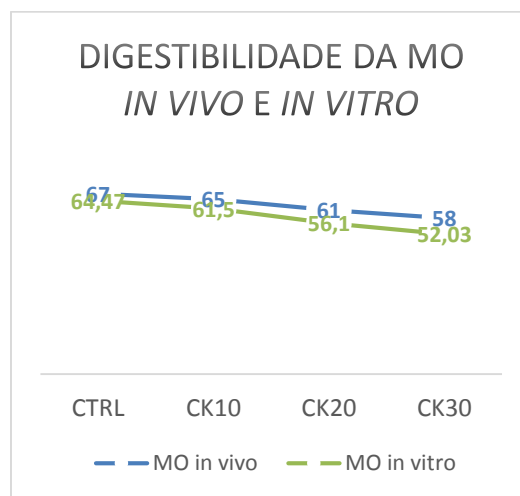
Com já visto anteriormente, para todos as variáveis os valores de CUD *in vitro* são quase sempre mais baixos do que os valores *in vivo*, com exceção da PB, em que se passa o inverso. No caso da PB a digestibilidade *in vitro* ser superior ao *in vivo* resultará de não haver endógeno que neste caso particular se deve ao elevado teor de fibra.



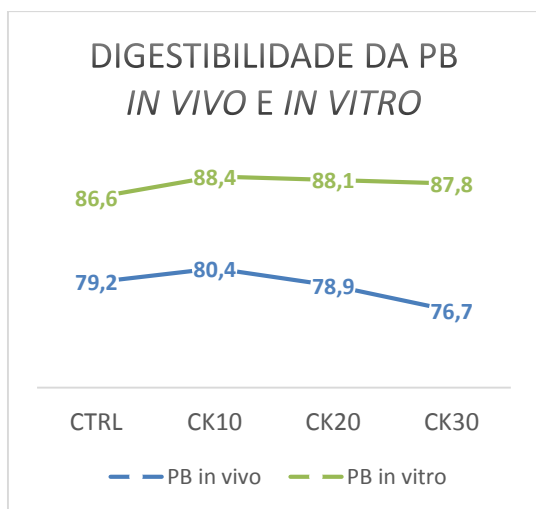
**Gráfico 9** – Análise de variância relativa à digestibilidade da MS *in vivo* e *in vitro* dos regimes alimentares para Coelhos para o Ensaio com *Brachiaria*



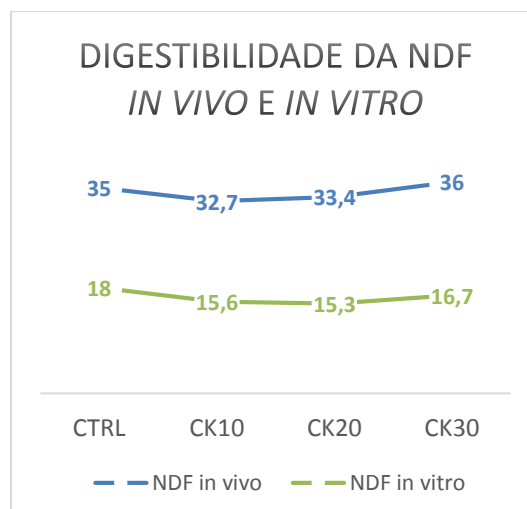
**Gráfico 10** – Análise de variância relativa à digestibilidade da MO *in vivo* e *in vitro* dos regimes alimentares para Coelhos para o Ensaio com *Brachiaria*



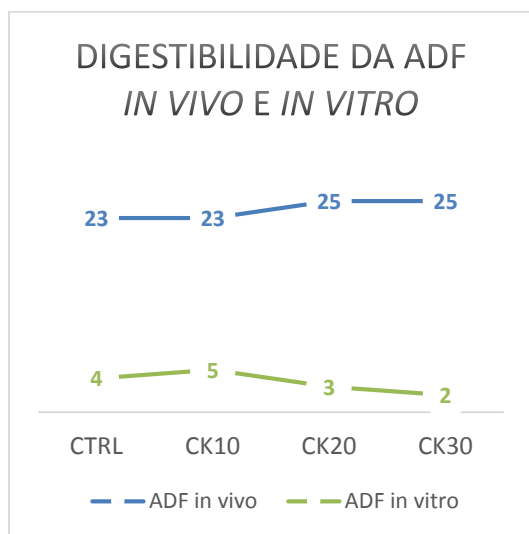
**Gráfico 11** – Análise de variância relativa à digestibilidade da PB *in vivo* e *in vitro* dos regimes alimentares para Coelhos para o Ensaio com *Brachiaria*



**Gráfico 12** – Análise de variância relativa à digestibilidade da NDF *in vivo* e *in vitro* dos regimes alimentares para Coelhos para o Ensaio com *Brachiaria*



**Gráfico 13** – Análise de variância relativa à digestibilidade da NDF *in vivo* e *in vitro* dos regimes alimentares para Coelhos para o Ensaio com *Brachiaria*



O facto de mais uma vez não se ter observado interação entre o método e o regime alimentar significa que embora os resultados sejam diferentes e a diferença seja altamente significativa os efeitos do regime, neste caso com a inclusão da *brachiaria*, são semelhantes e vão no mesmo sentido com ambos os métodos.

O regime vs. método não tiveram significativa interação, e o método, em todos os casos, foi determinante, sendo a sua interação muito significativa (\*\*\*), podendo concluir que o método utilizado influencia os resultados obtidos. Sendo verificado também por Carabaño, R., Nicodemus, García, Xiccato, Trocino, Pascual, Falcão-e-Cunha & Maertens, (2008), em que indicam que tanto o método, como o laboratório e/ ou mão-de-obra influenciam os resultados que se podem obter.

Resumidamente observámos com todos os regimes e em ambas as espécies que para os valores da digestibilidade da MS, da MO da PB e da Fibra:

O facto dos valores de digestibilidade *in vitro* serem significativamente diferente dos *in vivo* indica que não devem ser utilizados para cálculo do valor nutritivo dos regimes alimentares caso fosse esse o objetivo da utilização do método *in vitro*. Contudo, como as interações não foram significativas, traduz que as medidas de digestibilidade *in vitro* podem ser utilizadas para estudarmos efeitos dos diferentes regimes.

É possível que a causa da não existência de correlações significativas entre algumas variáveis se deva à homogeneidade dos regimes estudados: isoproteicos e com teores de fibra semelhantes. No caso dos regimes com *Brachiaria* estas ocorreram.

## 7. Conclusões e perspectivas futuras

Nas nossas condições experimentais podemos concluir que não é possível utilizar a digestibilidade *in vitro* para estimar o valor nutritivo de um alimento e/ou regimes alimentar. No entanto, é possível a sua utilização para evidenciar efeitos de diferentes regimes na digestibilidade global e da proteína bruta. Esta conclusão foi obtida através da observação da influência do método nos resultados obtidos (tabelas 9, 12 e 15; bem como através de todos os gráficos).

O método aplicado tem um grande impacto nos resultados finais, podendo levar a uma aproximação ou não dos resultados obtidos *in vivo*.

Em termos de perspectivas futuras, perante os resultados obtidos poderíamos comparar diferentes tempos de incubação, proporções entre reagentes e amostras de forma a adaptar o método à determinação da digestibilidade *in vitro* das fibras.

## 8. Referências Bibliográficas

Alves, P. A. G. (2013). *Utilização do Repiso de tomate na alimentação do leitão: digestibilidade, atividade fermentativa e morfologia da mucosa intestinal*. Dissertação de Mestrado em Engenharia Zootécnica – Produção Animal. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária/ Instituto Superior de Agronomia – Universidade de Lisboa.

Antonio, S. D., Gonçalves, M. B. F., Sanchez, L. M. B., Backes, A. A. & Silva, L. F. (1998). Modificações na técnica de digestibilidade *in vitro* para avaliar forragens de baixa qualidade. *Cienc. Rural*, vol.28 n°4. Acedido em Março 15, 2014, disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84781998000400022](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84781998000400022)

Boisen, S. & Eggum, B. O. (1991). Critical evaluation of *in vitro* methods for estimating digestibility in simple-stomach animals. *Nutrition Research Reviews*, 4: 141-162. Acedido em Outubro 15, 2013, disponível em: [http://journals.cambridge.org/download.php?file=%2FNRR%2FNRR4\\_01%2FS0954422491000136a.pdf&code=2b35b071e294f1cd5e74d9e8bd98cb77](http://journals.cambridge.org/download.php?file=%2FNRR%2FNRR4_01%2FS0954422491000136a.pdf&code=2b35b071e294f1cd5e74d9e8bd98cb77)

Boisen, S. & Fernández, J. A. (1997). Prediction of the total tract digestibility of energy in feedstuffs and pig diets by *in vitro* analyses. *Animal Feed Science Technology*, 68: 277-286.

Campos, F. P., Bose, M. L. V., Boin, C., Lanna, D. P. D. & Morais, J. P. G. (2000). Comparação do sistema de monitoramento computadorizado de digestão *in vitro* com os métodos *in vivo* e *in situ*. 2 - Uso do resíduo da matéria seca de forragens. *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol.29 n°2. Acedido em Janeiro 24, 2014, disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-35982000000200029&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982000000200029&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)

Campos, F. P., Bose, M. L. V., Boin, C., Lanna, D. P. D. & Morais, J. P. G. (2000). Avaliação do Sistema de Monitoramento Computadorizado de Digestão In Vitro. 3 - Desaparecimento da Matéria Seca e/ou FDN pela Produção de Gás. *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol. 29 n°2: 537-544. Acedido em Janeiro 24, 2014, disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbz/v29n2/5793.pdf>

Carabaño, R., Nicodemus, N., García, J., Xiccato, G., Trocino, A., Pascual, J.J., Falcão-e-Cunha, L. & Maertens, L. (2008). *In vitro* analysis, an accurate tool to estimate dry matter digestibility in rabbits. Intra- and Inter- Laboratory variability. *World Rabbit Science*, 16: 195-203.

Carabaño R., Piquer J., Menoyo D. & Badiola I. (2010). The Digestive System of the Rabbit. De Blas C., Wiseman J., *Nutrition of the rabbit*. CAB International Ed., pages 1-18. Acedido em Julho 8, 2014, disponível em: <http://wabbitwiki.com/images/7/7d/Nutrition.of.the.Rabbit.2ed-deBlas.Wiseman.pdf>

Castro, F. C. A. M. (2009). *Efeito dos taninos da bolota na digestibilidade da proteína bruta de dietas de porcos alentejanos de montanha*. Dissertação de Mestrado em Engenharia Zootécnica – Produção Animal. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária/ Instituto Superior de Agronomia – Universidade de Lisboa.

Duque, A. C. A., Lopes, F. C. F., Dornellas, R. A. C., Portugal, J. A. B., Verneque, R. S., Silva-Oliveira, J. & Azambuja, A. A. (2011). Digestibilidade da matéria seca de alimentos volumosos e concentrados, determinada por diferentes procedimentos *in vitro*. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal, Salvador*, vol.12, nº3, p.680-690. Acedido em Julho 7, 2014 disponível em: <https://www.google.pt/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=9&cad=rja&uact=8&ved=0CFwQFjAI&url=http%3A%2F%2Frevistas.ufba.br%2Findex.php%2Frbspa%2Farticle%2Fdownload%2F2091%2F1137&ei= tLJU-3jAqiP0AXJ1oGIDA&usq=AFQjCNEhcZE3l5h88ZbSkPYNJCHD6nTN1A&bvm=bv.71198958.d.bGE>

Falcão-e-Cunha, L. (2000). *Fisiologia digestiva do coelho – Aspectos mais relevantes*. Instituto Superior de Agronomia, Tapada da Ajuda.

Ferreira, M., Dutra, R. M., Machado, L. C., Ferreira, W. M., Silva, J., Moreira, G. R., Mauricio, R. M. & Melo, R. S. (2008). Avaliação da energia digestível e degradabilidade cecal *in vitro* do feno do terço superior de diferentes cultivares de Mandioca para coelhos. *I Jornada Científica e VI FIPA do CEFET Bambuí*. Acedido em Jan. 15, 2015, disponível em: [http://www.cefetbambui.edu.br/str/artigos\\_aprovados/Ci%C3%A4ncias%20Agrarias/84-PT-10.pdf](http://www.cefetbambui.edu.br/str/artigos_aprovados/Ci%C3%A4ncias%20Agrarias/84-PT-10.pdf)

Ferreira, L.M.A., Fontés, C.M. & Fernandes, T.H. (1999). A fibra em nutrição animal. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 94, 120-128.

Ferreira, W. M., Saad, F. M. O. B., Pereira, R. A. N. (n. d.). *Fundamentos da nutrição de coelhos*. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Departamento de Zootecnia. Acedido em Jan. 15, 2015, disponível em:

<http://www.coelhoecia.com.br/Zootecnia/Fundamentos%20de%20Nutricao%20de%20Coelhos.pdf>

Gomes, J. C. R. M. C. (2013). *Valorização de uma gramínea tropical Brachiaria Brizantha CV. Marandu para alimentação de coelhos – Enquadramento da produção de coelhos em Angola – Cabinda*. Dissertação de Mestrado em Engenharia Zootécnica – Produção Animal. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária/ Instituto Superior de Agronomia – Universidade de Lisboa.

Gidenne, T., Garcia, J., Lebas, F. & Licois, D. (2010). Nutrition and Feeding Strategy: Interactions with Pathology. de Blas C., Wiseman J., " *Nutrition of the rabbit* ", CAB International Ed., Chapter 10, 179-199. Acedido em Outubro 20, 2015, disponível em: <http://www.cuniculture.info/Docs/Documentation/Publi-Lebas/2010-2020/2010-Gidenne-et-al-Chapt-10-Nutri&pathology.pdf>

Lewis, A.J., Southern, L.L. (2001). Anatomy of the digestive system and nutritional physiology. In A. J. Lewis et al., *Swine Nutrition* (pp. 31-63). Boca Raton, FL,US: CRC Press.

Lojewska, D. B., Pieszka, M. (2011). Modulating gastrointestinal microflora of pigs through nutrition using feed additives. *Annals of Animal Science*. 11 (3), 333-355. Acedido em Junho. 16, 2015. Disponível em: <http://www.izoo.krakow.pl/czasopisma/annals/2011/3/art01.pdf>

Lopes, F. C. F., Dornelas, R. A. C., Portugal, J. A. B., Carneiro, J. C., Vernequel, R. S., Silva-e-Oliveira, J., Arcuril, P. B. & Duquell, A. C. A. (2010). Digestibilidade da matéria seca de silagens de milho e de suplementos concentrados determinada por procedimentos in vitro. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, vol 62, nº 5. Acedido em Julho 10, 2014, disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352010000500020&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352010000500020&script=sci_arttext)

Lourinhã, R. F. C. (2013). *Utilização do Repiso de tomate na alimentação de coelhos em crescimento e engorda*. Dissertação de Mestrado em Engenharia Zootécnica – Produção Animal. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária/ Instituto Superior de Agronomia – Universidade de Lisboa.

Low, A. G. (1993). Role of dietary fiber in pig diets. In D. J. A. Cole, W. Haresign & P. C. Garnsworthy (Eds.), *Recent Developments in Pig Nutrition 2*. (pp.137-162). Nottingham: Nottingham University Press.

Machado, L. C., Ferreira, W. M., Euler, A. C. C., Carvalho, W. T. V., Maurício, R. M. & Moreira, G. R. (2013). Métodos de digestibilidade *in vitro* na avaliação dos alimentos para coelhos. *Arquivos de Pesquisa Animal*, v.2, n.1, p.16-25. Acedido em Janeiro 27, 2014, disponível em: [file:///D:/Os%20meus%20documentos/Transfer%C3%AAs/Ancias/04%20mtodos%20de%20dig%20estibilidade%20in%20vitro%20na%20avaliao%20dos%20alimentos%20para%20coelhos%20\(1\).pdf](file:///D:/Os%20meus%20documentos/Transfer%C3%AAs/Ancias/04%20mtodos%20de%20dig%20estibilidade%20in%20vitro%20na%20avaliao%20dos%20alimentos%20para%20coelhos%20(1).pdf)

Makkar, H. P. S. (n. d.). Recent advances in in vitro gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources. *Animal Production and Health Section, Joint FAO/IAEA Division, International Atomic Energy Agency, P.O. Box 100, Wagramerstr. 5, A-1400 Vienna, Austria*. Acedido em Junho 18, 2014, disponível em: [http://www.fao.org/docrep/ARTICLE/AGRIPPA/570\\_en\\_toc.htm#TopOfPage](http://www.fao.org/docrep/ARTICLE/AGRIPPA/570_en_toc.htm#TopOfPage)

Martins, C. A. S. (2009). *Efeito da utilização de dreches de cerveja na digestibilidade, actividade fermentativa e morfologia intestinal do leitão ao desmame*. Dissertação de Mestrado em Engenharia Zootécnica – Produção Animal. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária/ Instituto Superior de Agronomia – Universidade de Lisboa. Acedido em Outubro 20, 2015, disponível em: [https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/1066/1/tese%20mestrado Carlos%20Martins.pdf](https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/1066/1/tese%20mestrado%20Carlos%20Martins.pdf)

McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D. & Morgan, C.A. (2002). *Animal Nutrition*. (6th ed.). (pp. 163-198). Harlow: Pearson Education Limited.

Meyer, R. M., Bartley, E. E., Julius, F. & Fina, L. R. (1971). Comparison of Four *in vitro* Methods for Predicting *in vivo* Digestibility of Forages. *Journal of Animal Science*, 32: 5: 1030-1036. Acedido em Fev. 7, 2015, disponível em: [https://www.animalsciencepublications.org/publications/search?volume=32&issue=5&first-page=1030&num-results=10&sort=relevance&journal\[jas\]=jas](https://www.animalsciencepublications.org/publications/search?volume=32&issue=5&first-page=1030&num-results=10&sort=relevance&journal[jas]=jas)

NFT Alliance (2013). *Matérias-primas: fatores que influenciam a variação de seus coeficientes de digestibilidade*. Acedido em Fev. 2, 2015, disponível em: <http://www.nftalliance.com.br/artigos/ingredientes/matrias-primas-fatores-que-influenciam-a-variao-de-seus-coeficientes-de-digestibilidade>

Pascual, J. J., Cervera, C. & Fernández-Carmona, J. (2000). Comparison of different *in vitro* digestibility methods for nutritive evaluation of rabbit diets. *World Rabbit Science*, Vol. 8(2): 93-97.



Pieper, R., Janczyk, P., Schumann, R., & Souffrant, W. B. (2006). *The intestinal microflora of piglets around weaning: with emphasis on lactobacilli*. *Archiva Zootechnica*, 6, 28-40. Acedido em Fev. 2, 2015. Disponível em:

[http://www.ibna.ro/arhiva/AZ%209/AZ%209\\_04%20Pieper.pdf](http://www.ibna.ro/arhiva/AZ%209/AZ%209_04%20Pieper.pdf)

Pujol, S. & Torrallardona, D. (2007). Evaluation of in vitro methods to estimate the in vivo nutrient digestibility of barley in pigs. *Livestock Science*, 109: 186-188. Disponível também em:

<http://www.sciencedirect.com>

Ribeiro, R. S. Á. (2012). *Utilização da castanha como fonte de amido na alimentação do leitão ao desmame*. Dissertação de Mestrado em Engenharia Zootécnica – Produção Animal. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária/ Instituto Superior de Agronomia – Universidade de Lisboa.

Stanco, G., Di Meo, C., Calabrò, S. & Nizza, A. (2003). Prediction of nutritive value of diets for rabbits using an *in vitro* gas production technique. *World Rabbit Science*, 11: 199-210.

Teixeira, P. S. S, Wechsler, F. S., Moura, A. S. A. M. T. (2011). Predição da digestibilidade da matéria seca de rações em coelhos em crescimento. *Revista Brasileira Zootecnia*, vol.40 no.12. Acedido em Outubro 5, 2014, disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-35982011001200024&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-35982011001200024&script=sci_arttext)

Tilley, J. M. A & Terry, R. A. (1963). A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Journal of British Grassland Society*, 18:104-11. Acedido em Jan 30, 2015, disponível em: <http://garfield.library.upenn.edu/classics1980/A1980JL65100001.pdf>

Van Soest ,P. J., Robertson, J.B. & Lewis, B.A. (1991). Methods for Dietary Fiber Neutral Detergent Fiber and Non-starch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74(10), 3583-3597. Acedido em Outubro 3, 2014, disponível em: <http://webpages.icav.up.pt/ptdc/CVT/098487/2008/Van%20Soest,%201991.pdf>

Vieira, A. R. D. G. (2009). *A fibra na alimentação do coelho – Dreches de cervejaria relativamente à luzerna e à polpa de beterraba*. Dissertação de Mestrado em Engenharia Zootécnica – Produção Animal. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária/ Instituto Superior de Agronomia – Universidade de Lisboa.

Villamidea, M. J., Carabaño, R., Maertens, L., Pascual, J., Gidenne, T., Falcão-E-Cunha, L. & Xiccato, G. (2009). Prediction of the nutritional value of European compound feeds for rabbits by chemical components and *in vitro* analysis. *Animal Feed Science and Technology*, 150: 283-294.